

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA
E HEPATOLOGIA

Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica e Risco Cardiovascular:
Efeitos da Suplementação com Probióticos

SAMANTHA THIFANI ALRUTZ BARCELOS

Tese de Doutorado

PORTO ALEGRE, BRASIL

2020

Samantha Thifani Alruz Barcelos

Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica e Risco Cardiovascular:
Efeitos da Suplementação com Probióticos

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva

PORTO ALEGRE, BRASIL

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Alrutz Barcelos, Samantha Thifani
Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica e Risco
Cardiovascular: Efeitos da Suplementação com
Probióticos / Samantha Thifani Alrutz Barcelos. --
2020.
165 f.
Orientador: Mário Reis Álvares-da-Silva.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Doença hepática gordurosa não alcoólica . 2.
Esteato-hepatite não-alcoólica. 3. Microbiota. 4.
Probiótico. 5. Risco cardiovascular. I.
Álvares-da-Silva, Mário Reis, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“O conformismo é o carcereiro da liberdade e o inimigo do crescimento
(John F Kennedy).”

“Você vê as coisas e diz “Por quê?”, mas eu sonho com coisas que nunca
existiram e digo: “Por que não?” (George Bernard Shaw)”

AGRADECIMENTOS

Essa parte acaba sendo um pouco difícil (não mais do que o estudo e seu processo em si, obviamente), mas é difícil pelo fato de parecer que sempre se esquece de alguém. Meus agradecimentos não são em ordem, até porque na vida tenho dificuldade de elencar pessoas mais ou menos importantes. Então vamos a elas.

Agradeço ao meu orientador, não só pela orientação em si, mas por ser um dos melhores chefes e preceptores que tive na residência. Não só a sua administração e transmissão do conhecimento como um todo, mas a sua preocupação para o bem-estar dos residentes. Quando ele me perguntou pela primeira vez como eu estava, como eu me sentia, achei que era uma brincadeira, mas a pergunta persistiu em todos os meses da minha residência de hepatologia (onde esse trabalho se iniciou), e com o tempo ele não se tornou apenas um chefe, mas alguém que eu podia conversar abertamente, fazer brincadeiras e rir junto.

Agradeço a uma grande chefe que também muito me ajudou, não só no trabalho como na vida. O seu nome está nos artigos que seguem essa tese, mas uma característica dela é sempre fazer mais do que precisa, e fazer da melhor maneira possível. Larisse Longo, te admiro pela sua leveza e garra em encarar a vida, por te ver passar por vários desafios enquanto convivemos, e por poder comemorar contigo a cada conquista.

Agradeço a minha amiga irmã Fernanda Barbosa, não só pelos anos de convivência (mesmo agora longe), mas por ouvir os meus lamentos, rir e chorar comigo, por estar presente física e mentalmente sempre que precisei, sem faltar uma vez. Obrigada por me incentivar mesmo falando que seria completamente demais uma pós com residência, e depois mudança, trabalho, três cachorros e uma pós, mas

mesmo assim falava “se é isso que você quer estou aqui, conte comigo”. Ela avaliou minha apresentação do exame geral de qualificação durante a folga de um plantão médico, e por essas e outras eu te admiro. Não só como amiga, mulher, dona de casa e médica. Mas por ser essa pessoa maravilhosa na minha vida.

Agradeço (vocês podem achar estranho) ao Bolacha, a Lola e a Cocada. Porque quando eu chegava em casa, arrasada, desesperançosa ou tudo isso e ainda extremamente cansada, eles me recebiam felizes, e a alegria deles me dava forças para uma jornada tripla de trabalho.

Agradeço ao meu marido Juliano (o Juju), que apesar de não ter me incentivado a fazer a pós ficou ao meu lado abrindo mão de um emprego certo em Santa Catarina, permanecendo os dois anos em Porto Alegre ao meu lado, trabalhando quando eu precisei estudar, enfrentando comigo as dificuldades e comemorando as pequenas vitórias do dia a dia.

Agradeço a minha mãe, pai, irmão e irmã, que mesmo longe me apoiaram e incentivaram. Que mesmo sem entender nada vibravam de alegria. Johann, maninho, você virou doutor antes de mim, sem ter feito medicina, e apesar de estares em outro continente você é a pessoa que me espelha além da mãe, com tua garra, foco e determinação. Morro de orgulho.

Agradeço aos amigos que fiz na pós-graduação (Laura, Matheus e Gabriel), pelas comemorações, incentivos, risadas, por compartilharem seu tempo e conhecimento comigo.

Agradeço as minhas colegas de pesquisa e batalha nesses anos do estudo: Amanda, Helena e Bruna. Só nós sabemos os apertos e dificuldades que tivemos de contornar, e o caminho só foi possível de ser seguido por causa de vocês.

Agradeço a todos os residentes do Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) que passaram comigo nos dois anos que estive ali. Sem eles não seria possível a realização desse trabalho. Por manejarem comigo os casos difíceis, por certas vezes pedirem minha opinião nas discussões, por seguirem quando as vezes eu precisava ver um paciente da pesquisa ou participar de uma cadeira obrigatória.

Agradeço aos professores e contratados da Hepatologia do HCPA (professor Hugo, Dr. Alexandre, Dr. Matheus e Dr. Antônio), pela paciência, transmissão de conhecimento e coleguismo. Pelo clima ótimo que vocês criavam, pelo fato de o ambulatório poder estar muito cheio, ter uma aula no meio, ter um pré ou pós transplantado grave aguardando ser atendido ou internado, mas graças a vocês aquilo tudo era só mais um desafio a ser vencido, completamente possível.

Agradeço a todos os pacientes que por mim passaram, direta ou indiretamente. Por todos os hospitais escola que passei grande parte dos pacientes mostrou-se mesmo paciente, durante aulas de semiologia e aprendizados iniciais. Ao longo dos anos alguns ainda tinham suas dúvidas em ver uma menina de um metro e meio entrar na enfermaria com um estetoscópio no pescoço, uma jarra para retirada de líquido ascítico em um braço e muitas vezes um material para cateter central no outro. Mas eles ao longo do tempo acreditaram em mim, e isso me deu forças. Mais tarde no ambulatório do HCPA, em um dos mais difíceis (o pré-transplante hepático), muitas vezes eles pediam pelo Dr. Alexandre, e eu não tirava a razão deles, mas fiquei extremamente feliz pelo Dr. Alexandre ter me apresentado como “a nova médica do transplante”, e eu discutia os casos com ele transbordando de alegria, e mais alegria ainda quando os pacientes passaram a formar vínculos comigo, principalmente após o transplante de fígado. Ficava feliz em passar nos pacientes do pós-transplante

quando o Dr. Alexandre estava de férias (discutindo os casos com o Dr. Matheus), e fornecia o meu telefone pessoal sem nenhum problema, para dar altas mais seguras.

Agradeço aos colegas da secretaria do Serviço de Gastroenterologia, Fernando e Soraia, pela parceria ao longo dos 2 anos.

Agradeço aos estagiários do Peru e Uruguai do projeto ECHO que passaram comigo nos dois anos, pela troca de conhecimento e por tornar os dias mais leve.

Agradeço a Dra. Janaina e ao Dr. Leonardo Schiavon. A Dra. Jana foi a primeira professora e modelo da Gastroenterologia que eu me espelhei. Pela sua leveza de conduzir a vida, sua habilidade de conciliar trabalho e família, por ter me dado a oportunidade do estágio na Escola Paulista de Medicina onde pude aprender muito durante a faculdade. E se não fosse por ela não teria conseguido entrar no doutorado, pelo fato de ter me orientado durante a realização de meu estudo de conclusão de curso o qual foi publicado em uma revista internacional.

Agradeço aos meus colegas e professores do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), por me mostrarem desafios extremamente difíceis que podiam ser vencidos, e pelo grande conhecimento que adquiri durante a residência.

Agradeço a todos os colegas e mestres que cruzaram o meu caminho. Todos de forma direta ou indireta tornaram possível meu caminho até aqui.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ANEXOS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica	16
2.2 Epidemiologia	20
2.3 Fatores de Risco e sua Relação com a Patogênese da Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica	21
2.4 Diagnóstico da Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica.....	26
2.5 Particularidades da Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica e Esteato-Hepatite Não-Alcoólica	28
2.6 Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica e o Risco Cardiovascular	30
2.7 microRNAs: Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica e Risco Cardiovascular	36
2.8 Particularidades sobre os escores clínicos para cálculo do risco cardiovascular	41

2.9 Tratamento do Risco Cardiovascular na Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica.....	44
2.10 Papel da Microbiota e dos Probióticos na Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica e no Risco Cardiovascular.....	48
2.10.1 Microbiota Intestinal.....	48
2.10.2 Eixo Intestino Fígado.....	49
2.10.3 Disbiose e Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica.....	51
2.10.4 Probióticos na Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica/Esteato-Hepatite Não-Alcoólica e seu Papel no Risco Cardiovascular.....	52
3. JUSTIFICATIVA.....	61
4. QUESTÃO DA PESQUISA.....	63
5. HIPÓTESE	64
6. OBJETIVOS	65
6.1 Objetivo Geral.....	65
6.2 Objetivos Secundários.....	65
7. ARTIGO EM INGLÊS	66
8. CONCLUSÕES.....	67
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	68
10. ANEXOS	72
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

RESUMO

Introdução: A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é a principal causa de lesão hepática crônica em todo o mundo, e seu tratamento específico deve estar disponível até o final desta década. A doença cardiovascular (DCV) é a maior responsável pelos óbitos a ela associados, de forma independente dos fatores de risco tradicionais. Apesar disso, raramente o risco cardiovascular (RCV) é um desfecho avaliado em estudos de DHGNA. Seus mecanismos associados são comuns e envolvem, entre outros, a inflamação sistêmica. A microbiota intestinal desempenha papel central na gênese da inflamação e sua alteração pode estar implicada no controle das lesões secundárias ao estado inflamatório, o que justifica este estudo.

Objetivo: Avaliar o RCV, através de escores clínicos, marcadores inflamatórios e de adesão endotelial, microRNAs e correlacionar com a microbiota intestinal, em pacientes portadores de DHGNA, com esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA), submetidos à suplementação de probióticos (PROBs). **Métodos:** Estudo duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, unicêntrico, em pacientes adultos com EHNA confirmada por biópsia hepática, divididos aleatoriamente em dois grupos: PROB e placebo (PLA). O grupo PROB recebeu durante 24 semanas dois sachês contendo 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*, e os pacientes alocados ao grupo PLA receberam formulação idêntica, contendo polidextrose e maltodextrina. Todos os pacientes foram monitorados rigorosamente quanto ao uso adequado, efeitos adversos e início de outras medicações. Uma visita presencial foi realizada a cada 45 dias. A avaliação clínica, física e laboratorial foi realizada antes e após a intervenção. Foi realizada a avaliação de atividade física, cálculo de escores de RCV, análise de marcadores inflamatórios e de disfunção endotelial, microRNAs circulantes

e avaliação da microbiota intestinal. **Resultados:** 46 pacientes foram recrutados (23 PROB; 23 PLAB), com idade média de 51,7 anos, predominância do sexo feminino e etnia branca. As características clínicas, demográficas e anatomopatológicas foram semelhantes entre os grupos no início do estudo. Escore NAS (do inglês, *NAFLD activity score*) foi de 4,13 ($\pm 1,87$) em ambos os grupos. A fibrose foi F1 em 69,6 e 60,9% (PROB e PLA, respectivamente). Não houve mudança significativa em relação aos escores de RCV, antropometria e avaliação laboratorial entre os grupos antes e após a intervenção. Igualmente, não houve alteração na alfa-diversidade avaliada pelo índice Shannon da linha de base até o final do estudo ($p = 0,89$). Houve predomínio do gênero *Firmicutes* antes do estudo e *Bacteroidetes* após a intervenção no grupo PROB, sem significância significativa. A concentração do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1, do inglês *plasminogen activator inhibitor-1*) diminuiu significativamente em ambos os grupos, bem como a expressão de miR-122 circulante, sem diferença significativa entre PROB e PLA. Houve diminuição do número de pacientes com alto RCV, de acordo com os índices Castelli-I (CRI)-I e coeficiente aterogênico (CA) em ambos os grupos. Nenhum efeito colateral grave foi relatado durante a realização do estudo. **Conclusão:** A suplementação com PROBs por 24 semanas não foi superior ao placebo na redução do RCV em pacientes com EHNA, e tampouco modificou a microbiota intestinal dos indivíduos estudados.

Palavras-chave: Doença hepática gordurosa não-alcoólica; Esteato-hepatite não-alcoólica; Microbiota; Probiótico; Risco cardiovascular.

ABSTRACT

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the leading cause of chronic liver damage worldwide, and its specific treatment should be available by the end of this decade. Cardiovascular disease (CVD) is the major responsible for the deaths associated with it, regardless of traditional risk factors. Despite this, cardiovascular risk (CVR) is rarely an outcome assessed in NAFLD studies. Its associated mechanisms are common and involve, among others, systemic inflammation. The intestinal microbiota plays a central role in the genesis of inflammation and its alteration may be involved in the control of lesions secondary to the inflammatory state, which justifies this study. **Objective:** Evaluate the CVR, through clinical scores, inflammatory markers and endothelial adhesion, microRNAs and correlate with the intestinal microbiota, in patients with NAFLD, with non-alcoholic steatohepatitis (NASH), submitted to probiotics supplementation (PROBs). **Methods:** Double-blind, randomized, placebo-controlled, single-center study in adult patients with NASH confirmed by liver biopsy, randomly divided into two groups: PROB and placebo (PLA). The PROB group received two sachets containing 10^9 colony forming units (CFU) of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis* for 24 weeks and the patients allocated to the PLA group received an identical formulation, containing polydextrose and maltodextrin. All patients were closely monitored for proper use, adverse effects and initiation of other medications. A face-to-face visit was carried out every 45 days. Clinical, physical and laboratory evaluation was performed before and after the intervention. The evaluation of physical activity, calculation of CVR scores, analysis of inflammatory markers and endothelial dysfunction, circulating microRNAs and evaluation of the intestinal microbiota were performed. **Results:** 46 patients were recruited (23 PROB;

23 PLAB), with a mean age of 51.7 years, predominance of females and white ethnicity. Clinical, demographic and anatomopathological characteristics were similar between groups at *baseline*. *NAFLD activity score* was 4.13 (\pm 1.87) in both groups. Fibrosis was F1 in 69.6% and 60.9% (PROB and PLA, respectively). There was no significant change regarding the CVR scores, anthropometry and laboratory evaluation between the groups before and after the intervention. Likewise, there was no change in the alpha diversity assessed by the baseline Shannon index until the end of the study ($p = 0.89$). There was a predominance of the genus *Firmicutes* before the study and *Bacteroidetes* after the intervention in the PROB group, without significant significance. The concentration of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) decreases significantly in both groups, as well as the expression of circulating miR-122, no significant difference between PROB and PLA. There was a decrease in the number of patients with high CVR, according to the Castelli-I (CRI)-I and atherogenic coefficient (CA) indices in both groups. No serious side effects were reported during the study.

Conclusion: PROBs supplementation for 24 weeks was not superior to placebo in reducing RCV in patients with NASH, nor did it modify the intestinal microbiota of the studied individuals.

Key words: Non-alcoholic fatty liver disease; Non-alcoholic steatohepatitis; Microbiota; Probiotic; Cardiovascular risk.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1: do inglês *ATP binding cassette transporter subfamily A, member 1*

AC: do inglês *atherogenic coefficient*

ALT: alanina aminotransferase

APRI: do inglês *aspartate aminotransferase to platelet ratio index*

ASCVD: do inglês *atherosclerotic cardiovascular disease risk estimator*

AST: aspartato aminotransferase

ASV: do inglês *amplicon sequence variants*

BMI: do inglês *body mass index*

CA: coeficiente aterogênico

CAP: do inglês *continuous attenuation parameter*

CHC: carcinoma hepatocelular

CRI: índice de risco Castelli

CT: colesterol total

CVD: do inglês *cardiovascular disease*

CVR: do inglês *cardiovascular risk*

DCV: doença cardiovascular

DHGNA: doença hepática gordurosa não-alcoólica

DM: diabetes *mellitus*

DNA: do inglês *deoxyribonucleic acid*

DRC: doença renal crônica

DSL: dislipidemia

ECR: ensaio clínico randomizado

EHNA: esteato-hepatite não-alcoólica

ELSA: do inglês *longitudinal study of adult health*

FA: fosfatase alcalina

FAST: FibroScan-AST

FIB-4: do inglês *fibrosis-4*

GGT: gama glutamil transferase

GLP-1: do inglês *glucagon-like peptide 1*

GM: do inglês *gut microbiome*

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HDL: lipoproteína de alta densidade

HOMA-IR: do *inglês homeostasis model assessment for insulin resistance*

IC: intervalo de confiança

ICAM-1: do inglês *intercellular adhesion molecule-1*

IL: interleucina

IMC: índice de massa corporal

IPAQ: do inglês *international physical activity questionnaire*

Kpa: quilopascal

LDL: lipoproteína de baixa densidade

MAMP: do inglês *microbial associated molecular pattern*

MAFLD: do inglês *metabolic associated fatty liver disease*

MS: do inglês *metabolic syndrome*

NAFLD: do inglês *non-alcoholic fatty liver disease*

NAS: do inglês *NAFLD activity score*

NASH: do inglês *nonalcoholic steatohepatitis*

NFS: do inglês *NAFLD fibrosis score*

OR: do inglês *odds ratio*

PAI-1: do inglês *plasminogen activator inhibitor-1*

PAMP: do inglês *pathogen associated molecular pattern*

PIVENS: do inglês *pioglitazone versus vitamin E versus placebo for the treatment of nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis*

PPP1R3B: do inglês *protein phosphatase 1 regulatory subunit*

PNPLA3: do inglês *patatin-like phospholipase domain-containing-3*

PCR: proteína C reativa

PLA: placebo

PROB: probiótico

RCV: risco cardiovascular

RISC: do inglês *RNA-induced silencing complex*

RI: resistência à insulina

SAF: do inglês *steatosis-activity-fibrosis*

SCORE: do inglês *systematic coronary risk evaluation*

SIBO: do inglês *small intestinal bacterial overgrowth*

SM: síndrome metabólica

SREBP: do inglês *sterol regulatory element binding protein*

T2DM: do inglês *type 2 diabetes*

TGLs: triglicerídeos

TM6SF2: do inglês *transmembrane 6 superfamily member 2*

TNF: do inglês *tumor necrosis factor*

UFC: unidades formadoras de colônia

VCAM-1: do inglês *vascular cell adhesion molecule-1*

WC: do inglês: waist circumference

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: As diversas faces da DHGNA, com possibilidades de progressão e regressão.....	17
Figura 2: Fluxograma para o diagnóstico de MAFLD.	19
Figura 3: Biogênese dos microRNAs.....	37
Figura 4: microRNAs e patogênese da DHGNA.	38
Figura 5: Componentes da barreira intestinal com os enterócitos, junções firmes e proteínas associadas.	50

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Ensaios clínicos randomizados na doença hepática gordurosa não alcoólica e seus objetivos cardiovasculares e hepáticos, no último ano.	72
Anexo 2: Ensaios clínicos randomizados na doença hepática gordurosa não alcoólica com objetivo cardiovascular, no último ano.....	84

1. INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é caracterizada pelo acúmulo de triglicerídeos (TGLs) em mais de 5% dos hepatócitos (esteatose) (1). A sua definição pressupõe a exclusão de causas secundárias (virais, medicamentosas e consumo excessivo de álcool) (1), porém recentemente um painel de consenso internacional propôs a troca da nomenclatura para doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD, do inglês *metabolic associated fatty liver disease*), no qual o diagnóstico de MAFLD deve ser baseado na presença de disfunção metabólica, e não na exclusão de outras condições como etilismo e outras doenças hepáticas (2). Uma vez que este estudo foi concluído antes da sugestão da mudança referida, será utilizado ainda o termo DHGNA.

A esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA) é o subtipo inflamatório da DHGNA, com presença de esteatose, injúria hepatocitária (demonstrada pela balonização de hepatócitos) e inflamação, com ou sem fibrose (3). A EHNA pode evoluir com fibrose hepática progressiva e desenvolvimento de cirrose; a esteatose hepática também pode apresentar fibrose, possivelmente relacionada a uma baixa taxa de progressão e regressão espontânea de EHNA para esteatose (4). Pacientes portadores de esteatose e EHNA possuem risco de desenvolver carcinoma hepatocelular (CHC), não necessitando a presença de cirrose para o seu aparecimento (5).

A DHGNA pode ser considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica (SM) (6), estando sua patogênese ligada a resistência à insulina (RI), e a presença de componentes da SM, tais como diabetes *mellitus* (DM), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e dislipidemia (DSL) exercendo um espectro bidirecional na DHGNA (7). Pela associação da DHGNA e obesidade, a incidência e prevalência

dessa condição clínica está aumentando, com a América do Sul tendo um dos maiores índices de prevalência em níveis continentais (8).

A maior causa de óbito relacionada a DHGNA são as doenças cardiovasculares (DCV), com a DHGNA causando um aumento do risco cardiovascular (RCV) independente dos fatores de risco tradicionais e da SM (9). Isso ocorre possivelmente pela associação da DHGNA com aumento do estresse oxidativo e disfunção endotelial, fatores altamente relacionados a DCV (10). Pacientes portadores de DHGNA têm níveis aumentados de marcadores inflamatórios e de disfunção endotelial relacionados a aterosclerose, entre eles a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1, do inglês *intercellular adhesion molecule-1*) e inibidor de ativador de plasminogênio-1 (PAI-1, do inglês *plasminogen activator inhibitor-1*) (11).

A estimativa do RCV pode ser realizada através de questionários, tais como Framingham, *Systematic Coronary Risk Evaluation (SCORE)* da Sociedade Europeia de Cardiologia, e o *Atherosclerotic Cardiovascular Disease risk estimator (ASCVD)* da Sociedade Americana de Cardiologia, compostos de exame físico e dados laboratoriais e clínicos (12-14).

Os microRNAs são pequenos RNAs não codificantes que possuem um importante papel na patogênese da DHGNA e sua progressão. Os microRNAs regulam vias metabólicas que estão alteradas em pacientes portadores de DHGNA, como metabolismo dos lipídeos e glicose (15). Os microRNAs estão associados à DCV e ao RCV na DHGNA através de diversos mecanismos entre eles o seu papel na lipogênese e oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*), associação com células endoteliais e regulação da biologia da placa de aterosclerose (16).

A base do tratamento da DHGNA ainda é a perda de peso, a qual está associada à resolução da doença, conforme a magnitude da perda ponderal, a saber: perda de 3-5% do peso corporal resulta em melhora da esteatose, mais de 5% em melhora da injúria celular hepática e inflamação, mais de 7% melhora EHNA, e mais de 10% reduz a fibrose (17). A atividade física, mesmo sem perda de peso, melhora o controle glicêmico e a oxidação lipídica, reduz a disfunção endotelial ligada à DCV, e diminui o RCV (18). Por outro lado, o tratamento específico da DHGNA ainda é limitado, e pode-se considerar que nenhum seja altamente efetivo tanto no controle de suas manifestações hepáticas, quanto na redução do RCV (19).

A microbiota intestinal é definida por um complexo de microrganismos com relações simbióticas com o hospedeiro, com funções, entre outras, digestão de ácidos graxos de cadeia curta, fermentação de fibras não digestivas, síntese de vitaminas, resistência à colonização por patógenos intestinais, e estímulo do desenvolvimento do sistema imune *etc.* (20). A presença da ligação entre o intestino e o fígado ocorre através da circulação sanguínea e dos ácidos biliares, sendo esses últimos responsáveis pelo efeito antimicrobiano e homeostático do intestino; esse eixo hepato-intestinal é essencial para a regulação do metabolismo sistêmico (21). A microbiota intestinal é a fonte primária de lipopolissacarídeos que atravessam a mucosa intestinal, entram na veia porta e são metabolizados pelo fígado (20). A disbiose intestinal está associada ao desenvolvimento e progressão da DHGNA (21). Alterações na permeabilidade intestinal e a prevalência de supercrescimento bacteriano estão aumentadas nesses pacientes, ocasionando a inflamação hepática e acúmulo de TGLs no fígado (22).

Probióticos (PROBs) são microrganismos vivos que podem ter efeitos benéficos para o hospedeiro sem efeitos colaterais (23). Seu papel na DHGNA supostamente está associado ao retardo da progressão da doença, através da modulação da microbiota intestinal, manutenção da permeabilidade intestinal e redução da resposta inflamatória (24). Ensaio clínicos randomizados (ECR) com diferentes cepas e concentrações de PROBs demonstraram a melhora da RI, níveis séricos de glicose, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), colesterol total (CT), TGLs, LDL e lipoproteína de baixa densidade (HDL, do inglês *high density lipoprotein*) (23, 25, 26). Pela melhora ocasionada no perfil lipídico após a utilização de PROBs, estes poderiam ser utilizados para diminuir o RCV associada a DHGNA. Há evidência da melhora do índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal no uso de PROBs, ambos associados à DCV (27). Entretanto, uma recente reunião de consenso da Sociedade Brasileira de Hepatologia sugere que, embora haja uma evidência teórica sólida e que pareçam promissores, os PROBs ainda não podem ser recomendados na prática clínica no tratamento da DHGNA (28).

É notável que ECR sejam realizados na DHGNA visando apenas o desfecho hepático e não o cardiovascular (29-31). Uma vez que a DCV é causa importante de mortalidade, seria recomendável que o RCV também fosse incluído como desfecho clínico nos estudos de DHGNA ou, agora, de MAFLD, uma vez que sendo somados os fatores de risco da própria DHGNA com outras situações clínicas incluídas no espectro de MAFLD, como a hepatite C, o RCV deve tornar-se ainda mais importante nesta condição clínica (9).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica

A DHGNA é caracterizada por esteatose demonstrada em exames de imagem, escores clínicos ou análise histológica do tecido hepático, em que a presença de mais de 5% de depósito de gordura nos hepatócitos autoriza o seu diagnóstico, uma vez excluídas outras causas de depósito gorduroso no fígado, como ingestão alcoólica significativa (igual ou superior a 20g etanol/dia em mulheres e a 30g etanol/dia em homens), hepatites virais e uso crônico de medicações esteatogênicas (1, 32). A EHNA é diagnosticada por biópsia hepática e injúria hepatocitária sobreposta à esteatose, na forma de inflamação e balonização, com ou sem a presença de fibrose (3). Os diversos estágios da doença (inflamação, esteatose e fibrose) podem progredir ou regredir, e o CHC pode advir de pacientes cirróticos ou não (5, 33) (Figura-1).

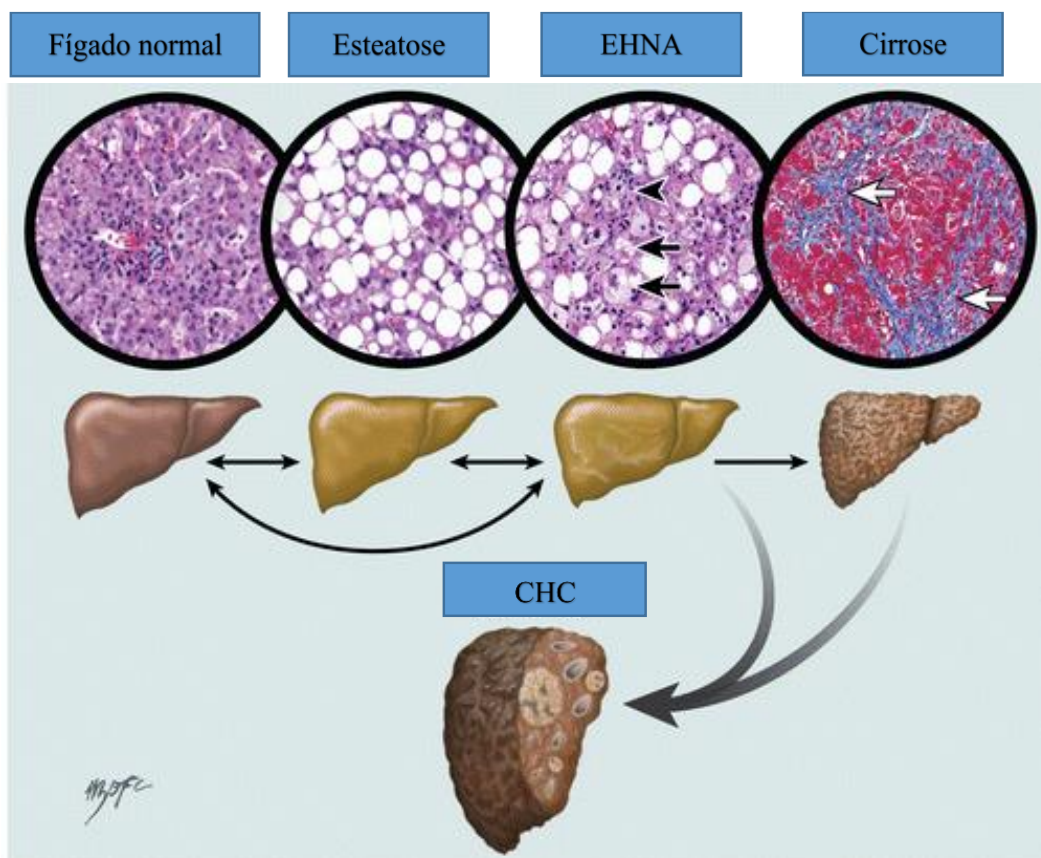


Figura 1: As diversas faces da DHGNA, com possibilidades de progressão e regressão.

A DHGNA é uma entidade clínica patológica que compreende um espectro de doenças hepáticas, que abrange desde a simples esteatose (presença de acúmulo de triglicerídeos em mais de 5% dos hepatócitos) sem o seu padrão inflamatório, até a EHNA, um padrão mais agressivo da doença, caracterizado por esteatose, balonização do hepatócito e inflamação, associado a vários graus de fibrose. O CHC não está ligado exclusivamente à cirrose. Abreviaturas: CHC: carcinoma hepatocelular, DHGNA: doença hepática gordurosa não-alcóolica e EHNA: esteato-hepatite não-alcóolica. Fonte: Arab *et.al* (2018) (33).

Como diferentes categorias de IMC poderem ter diferentes alterações metabólicas, assim como indivíduos com peso normal poderem ser metabolicamente doentes, com risco aumentado de DCV (34), há algum tempo debate-se o termo DHGNA: seria realmente o melhor para indivíduos portadores de esteatose hepática e SM?. De fato, um painel internacional de especialistas sugeriu neste ano, portanto, a sigla MAFLD, tendo como justificativa a heterogeneidade da DHGNA na prática clínica em relação à etnia, região geográfica, genética e epigenética, história familiar,

padrão metabólico, distribuição de gordura e também o IMC, sugerindo um termo inclusivo, sem necessidade de serem afastadas outras causas de esteatose, como o consumo de álcool (2). O diagnóstico de MAFLD deve-se basear na presença de disfunção metabólica, não na ausência de outras condições, sendo um diagnóstico de inclusão ao invés de um diagnóstico de exclusão, sendo a presença de outras hepatopatias como hepatites virais, medicamentosas e autoimunes denominadas de causas alternativas de doença hepática gordurosa. Os critérios são baseados na evidência de esteatose hepática somado a um dos três seguintes: sobrepeso/obesidade, presença de DM-2 ou evidência de desregulação metabólica (Figura-2) (35).

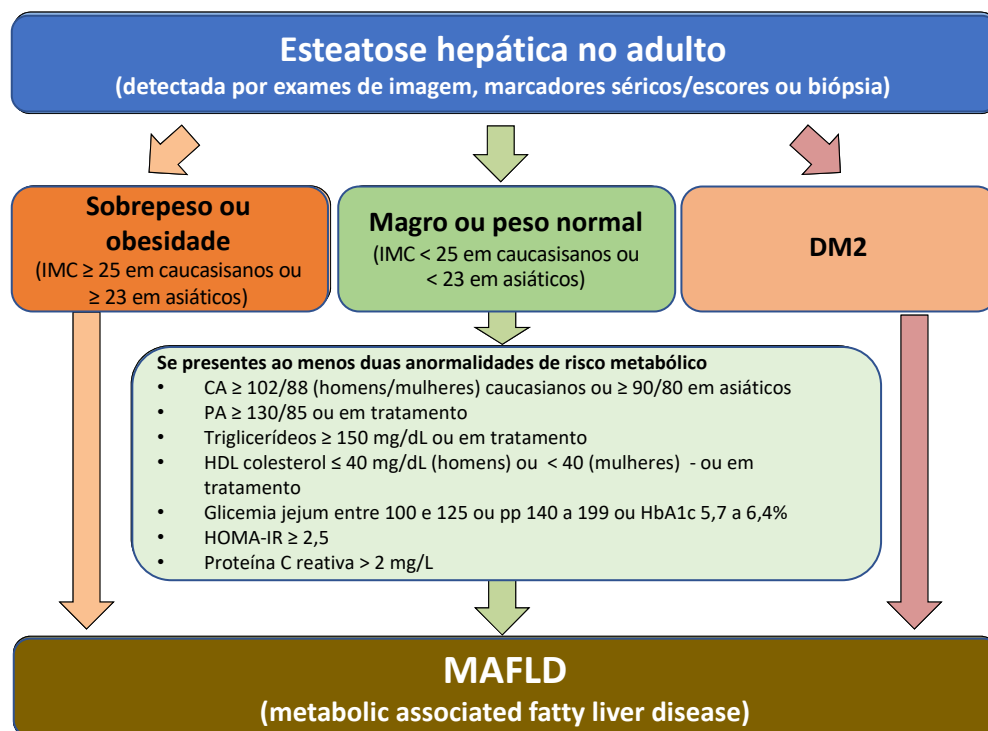


Figura 2: Fluxograma para o diagnóstico de MAFLD. Os critérios são baseados na evidência de esteatose hepática somado a um dos três seguintes: sobrepeso/obesidade, presença de DM-2 ou evidência de desregulação metabólica. Abreviaturas: CA: circunferência da cintura, DM-2: diabetes *mellitus*-2, HbA1c: hemoglobina glicosilada, HDL: lipoproteína de alta densidade, IMC: índice de massa corporal, MAFLD: doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica; PA: pressão arterial. Modificada de Eslam *et al.* (2020) (35).

A patogênese inicia-se com o acúmulo de TGLs nos hepatócitos. Os TGLs por sua vez são oriundos da combinação de glicerol e ácidos graxos. Esses últimos encontram-se no hepatócito após serem absorvidos da circulação ou produzidos a partir da glicose (lipogênese hepática). Os ácidos graxos são catabolizados principalmente pela beta oxidação nas mitocôndrias ou peroxissomas, e as quantidades em excesso são convertidas em TGLs e armazenados como gotículas lipídicas nos hepatócitos (6, 36).

Os mediadores lipídicos tóxicos como os ácidos graxos livres, colesterol livre e os fosfolipídios são prejudiciais para os hepatócitos, causando disfunção mas não a

sua morte; essa última ocorre resultante de um microambiente pró-inflamatório, em decorrência de uma cascata inflamatória e lesão hepatocitária (37).

Hábitos dietéticos inadequados, fatores ambientais e genéticos levam à RI, obesidade e mudanças na composição da microbiota intestinal (38). A RI é caracterizada pela redução da sensibilidade à insulina em todo o corpo, diminuindo o estímulo a captação de glicose (nos tecidos periféricos, principalmente no tecido esquelético) e diminuindo a supressão da sua gênese (principalmente hepática). Ela é um dos principais fatores para o desenvolvimento da esteatose/DHGNA, provocando aumento da lipogênese hepática e inibição prejudicada da lipólise no tecido gorduroso, causando um aumento no fluxo de ácidos graxos para o fígado (39).

2.2 Epidemiologia

Com o advento da modernização e com ela o aumento do sedentarismo e consumo de industrializados, a prevalência da DHGNA tem aumentado em todo o mundo (40). A prevalência global estimada por método de imagem é de cerca de 25,24% (intervalo de confiança - IC 95%, 22,10 - 28,65). A maior prevalência é relatada no Oriente Médio (31,79% [IC 95%, 13,48 - 58,23]) e América do Sul (30,45% [IC 95%, 22,74 - 39,44]) enquanto a menor prevalência é encontrada na África (13,48% [IC 95%, 5,69 - 28,69]). Estima-se que a prevalência de EHNA na população geral seja em torno de 1,5 - 6,25% (41).

Em níveis continentais a América do Sul parece ter as maiores prevalências de DHGNA, consequentes do aumento da obesidade (8). Estudo realizado em São Paulo evidenciou a DHGNA em 34,4% dos pacientes, diagnosticados por tomografia computadorizada (42). A incidência da DHGNA também tem aumentado, com dados

variando quanto ao método diagnóstico, sendo a sua incidência estimada em 31/1000 pessoas ano diagnosticadas pela avaliação de enzimas hepáticas, e 19.9/1000 pessoas ano diagnosticadas por ultrassom (43).

2.3 Fatores de Risco e sua Relação com a Patogênese da Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica

A DHGNA está frequentemente associada a adiposidade visceral aumentada (obesidade), RI, DM, HAS, aterosclerose e inflamação sistêmica (6). De acordo com a *International Diabetes Federation* (44) a SM é definida pela obesidade central (aumento da circunferência abdominal quanto aos padrões definidos pela especificidade étnica) associado a mais dois dos seguintes critérios: TGLs \geq a 150 mg/dL (ou tratamento atual de DSL); HDL inferior a 50 mg/dL para mulheres ou 40 mg/dL para homens (ou tratamento farmacológico); pressão arterial \geq a 130/85 mmHg (ou uso de anti-hipertensivos); glicemia de jejum \geq a 100 mg/dL (ou tratamento para DM).

A relação entre DHGNA e SM é bidirecional, sendo o primeiro um grande preditor do segundo; por sua vez, o conteúdo de gordura hepática está aumentado em indivíduos portadores de SM, independente da idade, sexo e IMC (45). A presença de SM também tem sido associada a um risco maior de prevalência e incidência de DHGNA, independente do gênero e ganho de peso (46). A SM está intimamente relacionada a inflamação e estresse oxidativo (47); e a inflamação hepática e fibrose estão associados com a presença e severidade da SM (48). A prevalência estimada de SM entre indivíduos portadores de DHGNA e EHNA é de 42,54% (IC 95%: 30,06 – 56,05) e 70,65% (IC 95%: 54,64 – 82,79), respectivamente (41).

Obesidade é o fator de risco mais comum e mais bem documentado para a DHGNA, sendo a obesidade abdominal com o aumento da circunferência da cintura o aspecto mais fortemente relacionado a DHGNA (1, 49). Enquanto é comum ter DHGNA em obesos, é ainda mais comum diagnosticar obesidade em pacientes com DHGNA (40). As estimativas da prevalência da obesidade nos pacientes com DHGNA e EHNA são de 51,34% (IC 95%: 41,38 - 61,20) e 81,33% (IC 95%: 55,16 - 94,28), respectivamente (41). Hipotireoidismo independente da obesidade é um fator de risco importante para DHGNA (1).

O ganho de peso aumenta a chance de DHGNA, mesmo quando o indivíduo permanece dentro da faixa de peso saudável estipulado pela altura (50). Alguns alimentos contribuem mais para o desenvolvimento da DHGNA, sendo a frutose um fator crucial, ingerida a partir de alimentos industrializados contendo sacarose e xarope de milho. O açúcar promove lipogênese e causa uma resposta inflamatória devido ao estresse oxidativo, a qual leva a apoptose dos hepatócitos, estando também relacionada a severidade da fibrose (51).

O DM-2 está fortemente relacionado a DHGNA, aumentando sua incidência independente do IMC e do nível das enzimas hepáticas, e deve ser avaliada em todos os pacientes portadores de DHGNA (32). Por sua vez, pacientes portadores de DHGNA apresentam o dobro do risco de incidência de DM, independente de outros fatores de risco para o diabetes (52). O DM aumenta o risco de desenvolvimento de EHNA, cirrose e CHC, e é um fator de risco independente para a mortalidade relacionada a hepatopatia (53). História familiar de DM-2 aumenta o risco de EHNA e fibrose em pacientes portadores de DHGNA (54). A prevalência estimada de DM-2 em pacientes com DHGNA e EHNA é 22,51% (IC 95%: 17,92 - 27,89) e 43,63% (IC 95%:

30,28 - 57,98), respectivamente (41). Por sua vez a taxa de esteatose hepática e fibrose avançada em pacientes portadores de DM-2 varia entre 65 - 73% e 7 - 18% respectivamente, dependendo do método diagnóstico não invasivo (55, 56). Com bases na biópsia hepática a prevalência de EHNA e fibrose avançada em pacientes diabéticos é 69% e 41%, respectivamente (57).

Cerca de 50% dos pacientes hipertensos têm DHGNA, com esse último sendo um fator independente para identificação de HAS (58). Presença e severidade da DHGNA também têm sido associadas a presença de HAS e pré-HAS, mesmo na ausência de outros fatores de risco para a SM (59). Um valor de pressão sanguínea aumentado, mesmo dentro da normalidade, prevê o desenvolvimento e progressão da DHGNA, e a presença de DHGNA prevê o risco de HAS (60, 61). HAS em pacientes com DHGNA praticamente dobra o risco de progressão da fibrose (62). A prevalência estimada de HAS entre DHGNA e EHNA é de 39,34% (IC 95%: 33,15 - 45,88) e 67,97% (IC 95%: 56,31 - 77,74), respectivamente (41).

Apesar da obesidade e da RI serem os fatores de risco mais prevalentes da DHGNA, há indivíduos com semelhantes estilos de vida e anormalidades metabólicas cuja DHGNA varia substancialmente, indicando que outros fatores contribuem para a patogênese dessa doença (40). Fatores hereditários sugerem que a genética possa desempenhar um papel importante na determinação fenotípica e do risco para DHGNA (63). Estudos familiares demonstram que parentes de primeiro grau de pacientes com DHGNA apresentam um maior risco de desenvolver a doença que a população geral. A associação é independente da presença de obesidade e leva a estimar que entre 38% e 100% do conteúdo de gordura hepática e variabilidade da

DHGNA são devido aos fatores herdados (64). Fatores genéticos também determinam o risco de doença metabólica e fibrose hepática (65).

Níveis de GGT também representam uma característica hereditária, além de uma covariância com fatores de risco para DHGNA, como RI, níveis lipídicos e pressão arterial diastólica (66).

Há uma grande variabilidade interétnica em suscetibilidade para DHGNA e EHNA (67). Uma recente metanálise demonstrou que a prevalência de DHGNA e o risco de EHNA eram maiores entre os hispânicos (risco relativo 1,09; IC 95%: 0,98 - 1,21), intermediários em caucasianos e menores em afrodescendentes (risco relativo 0,72; IC 95%: 0,60 - 0,87), enquanto o risco de fibrose não se apresentou diferente em relação a etnias, com dados conflitantes em relação a progressão da DHGNA e a presença de diferenças étnicas. Estudos populacionais sugerem que aproximadamente um em cada quatro hispânicos possuem DHGNA comparado a um em cada dez afrodescendentes, com diferenças menos marcadas em coortes de alto risco (68). Essas disparidades relacionadas a diferentes etnias e fígado gorduroso não são completamente compreendidas, com teorias incluindo fatores metabólicos, culturais e socioeconômicos, assim como hábitos de exercício, dieta, acesso a saúde e riscos ambientais (2). Parte dessa variabilidade interétnica é devida a conhecidos fatores de risco genéticos, em particular a variação no gene da proteína 3 contendo o domínio da fosfolipase patogênica PNPLA3 (do inglês *patatin-like phospholipase domain-containing3*) (69). O polimorfismo desse gene consiste na troca da isoleucina pela metionina no resíduo 148, o que induz uma perda de função na atividade enzimática, resultando em um aprisionamento de TGLs em gotículas lipídicas intra-hepáticas e células estreladas (70). Há uma associação predominante do

polimorfismo do gene PNPLA3 e o sexo feminino. Além disso a variante desse gene é mais frequente em hispânicos (49%) comparado a europeus americanos (23%) e afro-americanos (17%) (69).

As principais variantes genéticas associadas com o desenvolvimento e progressão da DHGNA são a membro 2 da superfamília transmembrana 6 (TM6SF2, do inglês *transmembrane 6 superfamily member 2*), PNPLA3, e subunidade reguladora 3B da proteína fosfatase 1 (PPP1R3B, do inglês *protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B*); todos esses genes codificam proteínas envolvidas na regulação do metabolismo lipídico hepático (40). O polimorfismo do gene PNPLA3 exerce uma forte influência não só no acúmulo de gordura intra-hepática, mas também na suscetibilidade de desenvolver dano histológico hepático mais severo (como fibrose e atividade necroinflamatória). Essas associações são mantidas a despeito de RI, glicemia de jejum e presença de obesidade (71).

Diferenças de gênero quanto ao risco de DHGNA também existem, sendo a prevalência de DHGNA e EHNA mais documentada em pessoas do sexo masculino. Mulheres apresentam um risco reduzido de desenvolver a DHGNA durante o seu período reprodutivo, enquanto após a menopausa elas perdem esse efeito protetor e têm uma prevalência de DHGNA comparável aos homens. Isso ocorre porque o estrogênio inibe a ativação das células estreladas e a fibrogênese (72). Além do gênero, o fator idade também está associado a DHGNA, com o aumento da prevalência em consonância com o aumento da idade (73).

2.4 Diagnóstico da Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica

A DHGNA é diagnosticada com base na história clínica, estudos laboratoriais e radiológicos que são complementados por histologia. A biópsia é a única que diferencia EHNA da esteatose simples (40). Apesar disso, há de se levar em conta o erro amostral, alto custo e riscos para o paciente. Apenas 1/50000 de todo o tecido hepático é analisado por meio da biópsia hepática (74). Para evitar erros de amostragem, é essencial coletar um fragmento histológico de dimensão adequada, (75). A incidência reportada de dor é em torno de 20%, com complicações graves como hemoperitônio em torno de 0,5% e mortalidade de 0,01% (74, 76).

A DHGNA engloba: a) esteatose simples, b) esteatose com inflamação lobular ou portal, mas sem balonização, ou c) esteatose com balonização, mas sem inflamação. O diagnóstico da EHNA necessita da presença associada de esteatose, balonização e inflamação lobular. Podem ser observadas outras características histológicas na EHNA, mas não são necessárias para o diagnóstico: inflamação portal, infiltrados polimorfonucleares, corpos de Mallory-Denk, corpos apoptóticos, núcleos claros vacuolizados, esteatose microvacuolar e megamitocôndrias (32).

Um dos escores mais utilizados para a classificação histopatológica é o NAS (do inglês *NAFLD activity score*) que engloba a graduação da esteatose. Outra classificação utilizada é o SAF (do inglês *steatosis-activity-fibrosis*), um escore que avalia a quantidade de gotículas lipídicas, o grau de atividade inflamatória (0-4) e o estágio de fibrose (77).

Uma abordagem inicial da DHGNA deve ser realizada com ultrassonografia, por ser um exame não invasivo, de baixo custo e com boa acurácia para esteatose

moderada e severa. Entretanto a sua sensibilidade diminui com a presença de IMC acima de 40 kg/m², e falha no diagnóstico de DHGNA com menos de 20% de esteatose (74, 78). Tomografia computadorizada é capaz de medir a quantidade de gordura hepática, mas é um método caro e envolve grande quantidade de radiação. Além disso, pode haver diferença nos valores de atenuação por base em tomógrafos de diferentes marcas e no depósito intra-hepático de ferro, o que frequentemente ocorre quando há depósito de gordura (79). A ressonância magnética é o padrão-ouro para quantificar a esteatose hepática, podendo detectar níveis acima de 5 - 10% (80).

Outro método de quantificação da esteatose é a elastografia transitória por meio do parâmetro de atenuação controlada (CAP, do inglês *continuous attenuation parameter*). A elastografia é um método não invasivo rápido e com alta precisão diagnóstica para cirrose e ausência de fibrose. O CAP pode detectar esteatose hepática acima de 10%. É uma técnica que mede a rigidez do tecido hepático por meio de ondas de cisalhamento, graduado em quilopascal (kpa). A principal deficiência, entretanto, são os valores pouco confiáveis na presença de IMC elevado ou espessura da camada torácica de gordura (81, 82).

A fibrose hepática é considerada o principal fator prognóstico em pacientes com DHGNA pela sua correlação com a taxa de sobrevida e complicações hepáticas. A fibrose avançada, determinada por marcadores não invasivos, é um preditor de mortalidade principalmente de causas cardiovasculares (83). Os marcadores não invasivos para calcular o estágio de fibrose são o escore de fibrose DHGNA (NFS, do inglês *NAFLD fibrosis score*), índice de relação AST sobre plaqueta (APRI, do inglês *aspartate aminotransferase to platelet ratio index*) e o índice de fibrose-4 (FIB-4, do inglês *fibrosis-4 index*) (84, 85).

2.5 Particularidades da Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica e Esteato-Hepatite Não-Alcoólica

A prevalência de EHNA entre os pacientes com DHGNA submetidos a biópsia hepática por indicação clínica (como alteração de transaminases e sinais clínicos de doença hepática) é estimada entre 60,64% (IC 95%: 49,56 – 70,72) e 69,25% (IC 95%: 55,93 – 79,98). A prevalência de EHNA entre pacientes com DHGNA que realizaram biópsia sem uma especificação clínica (com fins de estudo) é estimada entre 6,67% (IC 95%: 2,17 – 18,73) e 29,85% (IC 95%: 22,72 – 38,12). Aproximadamente, 41% (IC 95%: 34,69 – 47,13) dos pacientes com EHNA têm progressão da fibrose com uma média de progressão anual de 0.09% (IC 95%: 0,06 – 0,12) (41).

A DHGNA é geralmente considerada benigna pelo risco não significativo de progressão para fibrose avançada e mortalidade relacionada ao fígado, ao contrário da EHNA, a qual tem um risco substancial desses fatores. Entretanto já se sabe que ambas as doenças podem desenvolver fibrose hepática progressiva, porém os pacientes com DHGNA apresentam taxa mais lenta comparado a pacientes com EHNA. A taxa de progressão de fibrose global anual de pacientes portadores de DHGNA e estágio zero de fibrose corresponde a uma progressão média de 1 estágio acima de 14,3 anos (IC 95%: 9,1 - 50), enquanto essa taxa para pacientes portadores de EHNA corresponde a 7,1 anos (IC 95%: 4,8 - 14,3). Entretanto há uma heterogeneidade entre esses pacientes, que corresponde aos progressores rápidos de fibrose. Esse grupo corresponde a cerca de 17,2% dos pacientes portadores de DHGNA; e 18,2% dos pacientes portadores de EHNA (62).

Uma das características que diferencia DHGNA da EHNA é a presença de lesão hepatocitária (86). A demanda pelo metabolismo do excesso de ácidos graxos sobrecarrega a mitocôndria do hepatócito, que consegue se adaptar na fase de DHGNA, porém o aumento do estresse oxidativo hepático e dano oxidativo do DNA é acompanhado pela redução da capacidade de defesa antioxidante e aumento da resposta inflamatória, caracterizando a fase de EHNA (87). O estresse oxidativo e o desequilíbrio das citocinas pró e anti-inflamatórias leva a lipoperoxidação, apoptose e fibrogênese (39).

Em indivíduos portadores de RI, as células de gordura tendem a ser maiores e ter uma capacidade diminuída de estocar gordura. Quando a capacidade dos adipócitos é excedida, lipídeos começam a ser acumulados no fígado e em células musculares e pancreáticas, aumentando a RI e comprometendo ainda mais a secreção de insulina. O acúmulo de gordura nesses locais não é fisiológico e causa toxicidade celular (lipotoxicidade), produzindo espécies reativas de oxigênio e ácidos graxos livres oxidados, contribuindo para a progressão da EHNA. Ambos os marcadores séricos do estresse oxidativo e peroxidação lipídica intra-hepática estão aumentados na EHNA e se correlacionam com a gravidade histológica da doença hepática e com a RI. Células gordurosas disfuncionais produzem quantidades excessivas de citocinas inflamatórias indutoras de RI e aterosclerose. Ácidos graxos livres podem modular as vias de apoptose do hepatócito, sendo essa a principal forma de morte celular em pacientes com EHNA (39).

Ativação do sistema imune é outra característica da EHNA. Os clássicos efetores da resposta imune são as células de Kupffer e o recrutamento de macrófagos, mas as células T *natural killer* também desempenham o seu papel no processo,

recrutando macrófagos e contribuindo para a progressão da doença hepática (88). Vários componentes podem causar inflamação no fígado gorduroso: ácidos graxos livres, padrões moleculares associados a danos (liberados de hepatócitos em processo de morte), inflamação induzida pela ativação de receptores *toll-like*, ativação dos complexos do inflamassoma em células imunes alvo, etc. (89).

A presença de SM é um forte preditor da presença de EHNA em pacientes com DHGNA. A presença de um número aumentado de distúrbios metabólicos, tais como RI, DM, HAS, DSL e obesidade visceral, parece aumentar o risco de doença hepática progressiva (90).

2.6 Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica e o Risco Cardiovascular

A despeito da fibrose estar relacionada à gravidade da doença hepática, no total, menos de 5% dos pacientes com DHGNA morrem devido a causas relacionadas ao fígado (54, 91), sendo a principal causa de óbito a DCV (92). Entre 31 ECRs, apenas sete avaliaram RCV de uma forma mais estruturada (Anexo-1). No último ano apenas cinco ECRs estudaram a DHGNA tendo como desfecho o RCV, abordando objetivos como medidas antropométricas, perfil lipídico e glicêmico, HOMA-IR, PCR, fluxo da artéria braquial e espessura íntima-média carotídea (esses dois últimos em apenas 1 artigo) (Anexo-2). Assim, a maioria dos estudos utiliza poucos marcadores indiretos para avaliar o RCV.

A relação entre fatores de risco para DHGNA e DCV é bidirecional (60) com gordura hepática basal sendo associada a um maior risco de HAS e DM, ambos relacionados ao aumento do RCV (60, 93). Entretanto a presença de DHGNA e de marcadores subclínicos de aterosclerose (espessura médio-intimal da artéria

carotídea, rigidez arterial, calcificação arterial coronariana) estão relacionados ao aumento de eventos cardiovasculares a despeito da SM e seus componentes (94, 95). Isso possivelmente é causado pelo aumento do estresse oxidativo, inflamação subclínica, disfunção endotelial e anormalidades lipídicas (94).

Pacientes com DHGNA, independente da severidade da lesão hepática, têm aumento da espessura da camada íntima-média e maior prevalência de placas carotídeas; sendo a esteatose o maior preditor independente de risco de lesão vascular, seguido da idade e pressão sistólica (96). Uma metanálise que inclui 3.497 indivíduos concluiu que a ultrassonografia para diagnóstico de DHGNA foi fortemente associada a maior espessura da camada íntima-média da carótida, correspondente a uma maior prevalência de placas ateroscleróticas (97).

Embora os mecanismos subjacentes entre a associação de DHGNA e aterosclerose não sejam bem compreendidos, algumas causas atribuídas são deficiência de autofagia, RI, inflamação, estresse oxidativo, distúrbio lipídico, peroxidação lipídica e doença renal crônica (DRC) (98).

A severidade da DHGNA no que diz respeito ao RCV é associada ao remodelamento e disfunção subclínica do miocárdio (99), DRC (100), falência cardíaca congestiva e arritmia (101) e por consequência, morbimortalidade na DCV (102). Pacientes portadores de DHGNA possuem alterações precoces no metabolismo do substrato cardíaco, produzindo consequências funcionais, estruturais e arrítmicas do miocárdio, sendo a DHGNA um fator independente para o remodelamento cardíaco (103). Há uma forte associação de DHGNA com mudanças precoces na morfologia do ventrículo esquerdo (disfunção sistólica e diastólica), sendo a DHGNA um determinante para a função cardíaca (104). Estudos comprovam

que a DHGNA é um fator de risco independente para o desenvolvimento de fibrilação atrial e prolongamento do intervalo QT na população em geral (105, 106), e calcificação cardíaca (valvas aórtica e mitral) e arritmias ventriculares em pacientes portadores de DM-2 (107, 108).

A DHGNA também foi associada a maior prevalência de placas arteriais coronarianas vulneráveis e de alto risco (definidas pela presença de remodelamento e outros fatores tomográficos), o que predispõem ao infarto agudo do miocárdio, independente dos fatores tradicionais de DCV, extensão e severidade da aterosclerose coronariana (109).

Há uma correlação positiva entre a severidade histológica da DHGNA, aparecimento precoce de aterosclerose carotídea, e severidade da SM (94). Quanto à fisiopatologia, a DHGNA especialmente nas formas mais graves (maior a presença de esteatose em exame de imagem associada ao aumento dos níveis séricos de GGT ou alto estágio de fibrose pelo NFS ou pela biópsia) exacerba a RI hepática/periférica, predispõem a DSL aterogênica e libera variedades de fatores pró-inflamatórios, vasoativos e trombogênicos que podem promover o desenvolvimento de DCV e eventos cardiovasculares fatais e não fatais (101, 102, 110). Pressão sanguínea tem uma relação contínua e consistente com a incidência de DCV. Assim sendo, a HAS é um dos fatores de risco mais importantes associado ao aparecimento de DCV (111).

Aumento dos níveis séricos de GGT estão associados com o aumento da incidência de doença coronariana, infarto e acidente vascular encefálico. Isso ocorre em virtude de a GGT estar ligada ao estresse oxidativo sistêmico e à placa aterosclerótica, associada a geração de espécies reativas de oxigênio. A GGT está presente na placa de aterosclerose e pode catalisar a oxidação de LDL, contribuindo

para a evolução e ruptura da placa (112). Há também respaldo na literatura quanto a influência da ALT no RCV. Isso deve-se ao fato dessa aminotransferase estar associada a disfunção endotelial e aterosclerose carotídea; o valor preditivo de ALT para eventos coronarianos é independente de fatores de risco tradicionais (tabagismo, sedentarismo, perfil metabólico) e componentes da SM (113).

Inflamação tem sido associada à síndrome coronariana. A PCR é um forte marcador de eventos cardiovasculares, pois ativa células endoteliais para expressar moléculas de adesão, entre elas a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1, do inglês *intercellular adhesion molecule-1*) molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion molecule-1*) e selectinas. A PCR ativa macrófagos para expressar citocinas, aumentando a captação de LDL (114).

Formas solúveis das moléculas de adesão vascular estão super-reguladas em pacientes com maior teor de gordura hepática, sugerindo uma maior disfunção endotelial e injúria vascular (115). E a inflamação e o estresse oxidativo parecem estar envolvidos no início e na progressão da DHGNA (116).

Marcadores de disfunção endotelial, biomarcadores de inflamação crônica e estresse oxidativo, como VCAM e ICAM -1, estão associados ao aumento do acúmulo de leucócitos, um evento precoce na aterogênese. Estas moléculas de adesão foram detectadas na aterosclerose humana (117, 118). No estudo de Linhares *et al.* associação entre ICAM-1, VCAM-1 e SM também foi observada (118).

A molécula de adesão VCAM-1 prevê a presença de fibrose ≥ 2 em pacientes portadores de DHGNA (119). Um estudo demonstrou que pacientes portadores de DHGNA têm aumento dos níveis de ICAM-1 e PAI-1. No entanto, apenas os níveis

séricos de ICAM-1 se correlacionaram com a gravidade histológica da doença hepática. Adicionalmente, foi observada uma correlação significativa entre a expressão do ICAM-1 no infiltrado inflamatório lobular e em ambos os graus de esteatose hepática e a severidade de atividade necroinflamatória. Os resultados desse estudo põem o ICAM-1 como um marcador de lesão hepática (11). Além do PAI-1, outros fatores pró-coagulantes como fibrinogênio e fator VII estão aumentados em pacientes portadores de DHGNA, exacerbando o status inflamatório da SM (120).

A fibrinólise é inibida pelo PAI-1 e um aumento da concentração de PAI-1 no plasma pode induzir a um estado de hipercoagulabilidade. Em condições patológicas, a produção de PAI-1 pode ser super-regulada pelos fatores inflamatórios. Níveis elevados de PAI-1 foram associados à atividade fibrinolítica prejudicada em acidente vascular cerebral e doença arterial coronariana e são preditores de eventos cardiovasculares futuros. Além disso, o antígeno PAI-1 e os níveis de atividade estão elevados em pacientes com DM-2, hiperinsulinemia e naqueles com RI (121, 122).

Jung *et al.* (121) em uma metanálise, demonstraram que os níveis de antígeno PAI-1 eram mais elevados em pacientes que tiveram eventos cardiovasculares maiores (uma composição de óbito, infarto agudo do miocárdio ou evento cerebrovascular) com uma diferença média de 6,11 ng/ml (IC 95%: 3,27 – 8,96, $p < 0,001$). Os fatores de risco básicos que influenciam os níveis de PAI-1 são tabagismo, dieta rica em gorduras e exercícios. Quando restritos a estudos de alta qualidade, os pacientes com eventos cardiovasculares maiores obtiveram um PAI-1 de 5,22 ng/ml (95% IC: 2,97 – 7,54, $p < 0.001$). Chang *et al.* (123) em um estudo de caso-controle observou que o PAI-1 foi independentemente associado à DHGNA após o ajuste para outros fatores, incluindo IMC, SM, perfil e função hepática, marcadores de fibrose

hepática e níveis de leptina e adiponectina. Na obesidade, a DHGNA contribui de forma independente para o aumento dos níveis de PAI-1. Por outro lado, o aumento da concentração de PAI-1 levou à perda da remoção de trombos do sistema vascular e pode ter influenciado no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas.

Tofler *et al.* (124) conduziram um estudo de acompanhamento de 10 anos, 3.203 indivíduos sem DCV prévia foram avaliados e o PAI-1 foi analisado quatro anos após o início do estudo para determinar o efeito da mudança no RCV. Os níveis de PAI-1 foram de 29,1 ng/ml *versus* 22,1 ng/ml para aqueles com e sem DCV incidente respectivamente; $p < 0,001$. Níveis aumentados de PAI-1 foram associados a um perfil adverso de RCV, associado ao aumento da idade e gênero, especialmente antes da menopausa. Os níveis de PAI-1 também foram associados a HAS, DM-2, níveis de TGLs e inversamente correlacionados ao nível de HDL. Em conclusão, foi relatado que a análise de PAI-1 é preditiva de DCV após considerar os fatores de risco estabelecidos.

Ajmera *et al.* (125) observaram que os pacientes com EHNA apresentavam níveis mais elevados de PAI-1. Na análise multivariada ajustada para fatores clínicos, apenas o aumento do PAI-1 foi independentemente associado à EHNA definitiva (OR: 1,20, IC 95%: 1,08 – 1,34, $p = 0,001$). O PAI-1 foi associado ao aumento da idade, IMC, AST, RI e triglicerídeos. Pacientes com esteatose moderada a grave ($> 33\%$) apresentaram PAI-1 alto em comparação com aqueles com esteatose leve ou ausente ($\leq 33\%$) e os pacientes com balonização na biópsia apresentaram níveis mais elevados de PAI-1.

A prevalência de DRC (definida pela taxa de filtração glomerular $<60\text{mL/min/1,73m}^2$ e/ou albuminúria anormal) está aumentada em pacientes

portadores de DHGNA, com uma forte associação entre a presença e severidade da DHGNA e o estágio e o risco de desenvolvimento da DRC (126). Essa última é um fator independente para o aumento de DCV (127, 128).

2.7 microRNAs: Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica e Risco Cardiovascular

Nos últimos anos diversos estudos estão sendo realizados para avaliar o papel dos microRNAs em diversas comorbidades (129, 130). Os microRNAs são moléculas de cadeia simples, de aproximadamente 18-24 nucleotídeos não codificantes que regulam a degradação ou tradução do RNA mensageiro (mRNA), modulando assim a expressão gênica (91). Grande parte dos mecanismos de expressão gênica são regulados por RNA não codificantes – transcritores de RNA que não produzem proteínas (86). Geralmente os microRNAs são gerados pela RNA polimerase II, em transcritos primários longos (pri-microRNA) que formam uma estrutura de forquilha (131). No núcleo das células a RNase III, também conhecida como complexo Drosha, processa este pri-microRNA em pré-microRNA que é a estrutura precursora dos microRNAs (131). Os pré-microRNA são exportados para o citoplasma através da exportina-5. No citoplasma o pré-microRNA é clivado pela enzima Dicer, também conhecida como RNase II, formando um microRNA maduro de dupla fita que será separado, por uma helicase de RNA (131). Este microRNA maduro será incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*), o qual vai reconhecer e interagir com o mRNA alvo, ocasionando a repressão da expressão gênica, ou seja, esta interação entre o microRNA maduro e o mRNA impossibilita que os ribossomos consigam traduzir a informação contida no mRNA, ocasionando a interrupção do processo inicial de tradução e/ou a indução de

sua clivagem. A outra fita complementar é degradada. A escolha de qual fita será o microRNA maduro e qual será degradada é de acordo com a estabilidade termodinâmica, dando-se preferência para a degradação da fita cuja a extremidade 5' possui menor estabilidade (Figura 3) (131). Esses processos podem acontecer devido ao reconhecimento e ligação deste microRNA às regiões específicas do mRNA alvo, tais como as extremidades 3'UTR e 5'UTR ou diretamente ao DNA.

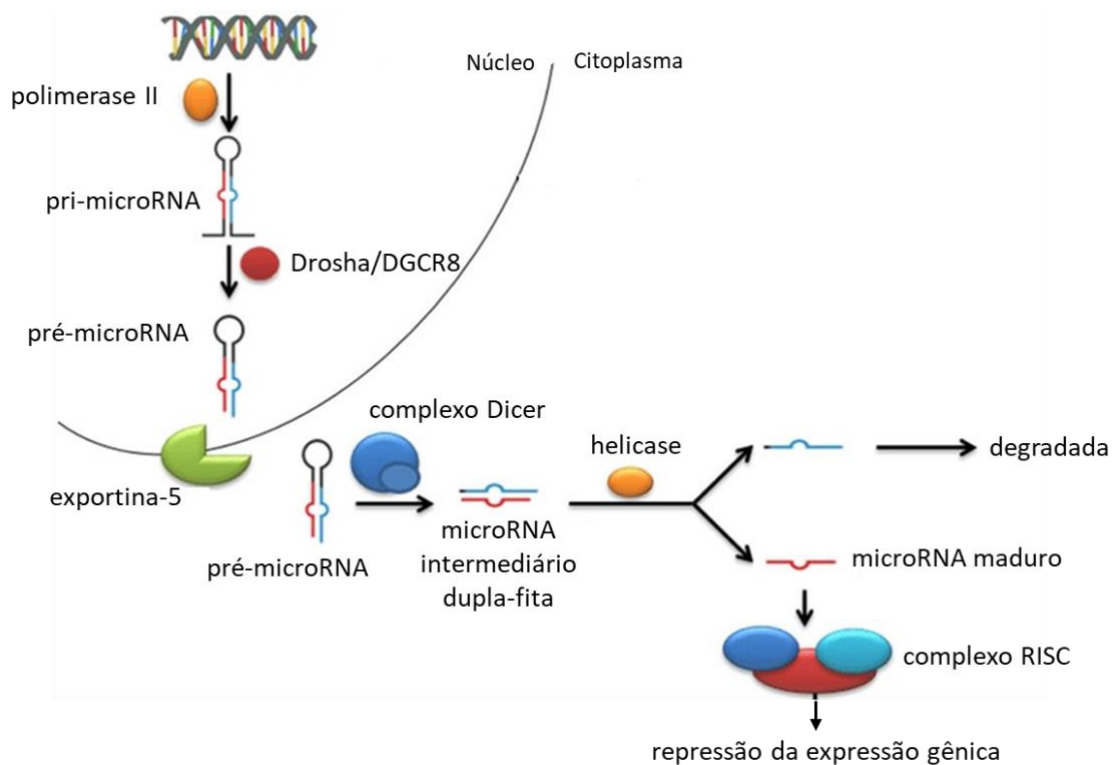


Figura 3: Biogênese dos microRNAs. O microRNA é transcrito primário em pri-microRNA pela RNA polimerase II, após é clivado pelo complexo Drosha a pré-microRNA no núcleo. O pré-microRNA é exportado para o citoplasma através da proteína exportina-5. No citoplasma o complexo Dicer, cliva o pré-microRNA em um microRNA maduro de dupla fita, as quais serão separadas por uma helicase de RNA, sendo uma das fitas degradada. A fita de microRNA madura é incorporada ao complexo RISC e irá interagir com mRNA alvo, tornando-se apto a regular a expressão dele. Abreviaturas: RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA. Fonte: Samir *et al.* (2016) (132).

A DHGNA está associada com a desregulação de muitos microRNAs hepáticos, associados a desenvolvimento da esteatose e sua progressão para EHNA, fibrose, cirrose e CHC (Figura-4) (133). Tal fato pode ser explicado pelo papel dos microRNAs em regular vias metabólicas associadas a lipogênese, captação hepática de lipídeos séricos em excesso, oxidação lipídica, glicólise, gliconeogênese; tais vias estão desreguladas em portadores de DHGNA (15). Devido a essa relação e também a associação dos microRNAs ao estresse oxidativo, são considerados um biomarcador e potencial alvo terapêutico da DHGNA (134). E também pela relação dos microRNAs com a lipogênese, LDL oxidados e células endoteliais eles apresentam um importante papel na regulação da biologia da placa de aterosclerose em humanos (16).

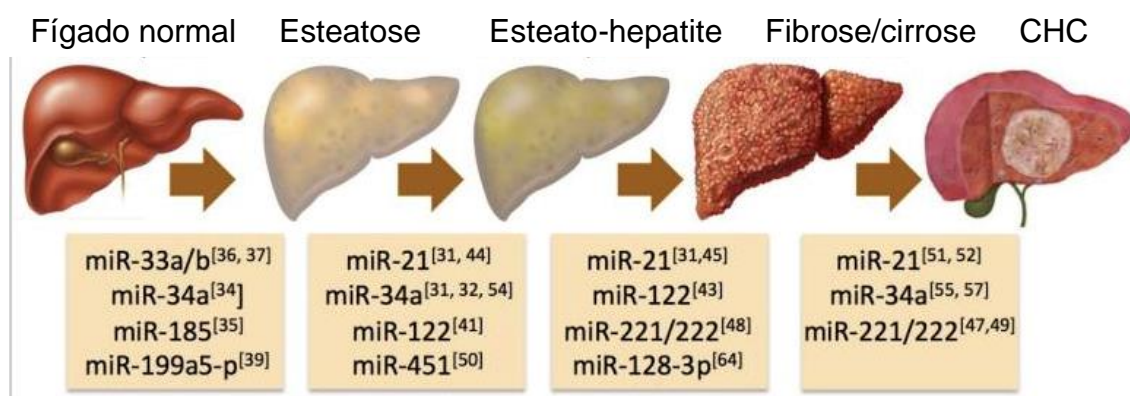


Figura 4: microRNAs e patogênese da DHGNA. Implicação dos diferentes microRNAs na evolução da DHGNA. Abreviaturas: CHC: carcinoma hepatocelular e DHGNA: doença hepática gordurosa não-alcóolica. Fonte: modificado de Baffy (133).

A relação com a DCV também pode ser comprovada pela deleção de uma enzima responsável pela síntese de microRNAs, o que resulta em fenótipos letais nas linhagens vasculares e do miocárdio (135). O tecido vascular lesado possui uma

expressão distinta de microRNAs quando comparado ao saudável, demonstrando o seu papel em doenças vasculares (136). Uma regulação alterada de microRNAs pode estar relacionada a HAS (137), o que aumenta o risco de DCV.

Os microRNAs poderiam ter um papel terapêutico para o manejo de DCV (138). Eulalio *et al.* demonstraram que a administração dos microRNAs 590 e 199a em ratos e camundongos promoveu regeneração de cardiomiócitos após infarto e quase a recuperação completa dos parâmetros funcionais cardíacos (139). Os microRNAs também podem ter valor diagnóstico relacionado a DCV, principalmente os cardio específicos que podem ser utilizados como marcadores precoces de infarto agudo do miocárdio em humanos (140).

O miR-122 é o microRNA hepático mais expresso, aproximadamente 70% de todas as cópias dos microRNAs hepáticos (15). Em estudos com ratos submetidos a dieta rica em gordura o silenciamento do miR-122 resulta na diminuição do colesterol hepático e na biossíntese de ácidos graxos, associado a uma redução no CT e TGLs e diminuição da esteato-hepatite (141). A expressão do miR-122 está diminuída no tecido hepático de portadores de DHGNA, enquanto os ácidos graxos livres aumentam a liberação hepática do miR-122, inibindo a produção de TGL hepático e músculo esquelético (142). Uma metanálise evidenciou aumento sérico do miR-122 em pacientes com DHGNA *versus* controles saudáveis, sendo um marcador potencial para diferenciar a DHGNA e EHNA (143), com o nível sérico de miR-122 estando relacionado ao grau de severidade da esteatose hepática (144).

Pirola *et al.* relatam que a expressão do miR-122 está associada a balonização do hepatócito, e alteração dos níveis séricos de ALT, além de demonstrarem uma possível associação entre este microRNA com a elevação da pressão arterial e dano

endotelial (134). Miyaaki *et al.* após biópsia hepática de 67 pacientes com diagnóstico de DHGNA demonstraram associação do miR-122 hepático e sérico com a esteatose e fibrose hepáticas e capacidade de prever presença de EHNA e fibrose (145).

Fatores da proteína de ligação a elemento regulador de esterol 1 e 2 (SREBP 1 e 2, do inglês *sterol regulatory elemento binding protein 1 and 2*) são genes hospedeiros do miR-33. Este microRNA está localizado no íntron 15 do gene SREBP2 no cromossomo 22. Os SREBPs são reguladores da transcrição de genes responsáveis pela síntese de colesterol e lipídeos, através da transativação dos genes do receptor LDL e da biossíntese de colesterol (146).

O miR-33a atua na repressão pós-transcricional da subfamília A de transportador de cassete de ligação do ATP (ABCA1, do inglês *ATP binding cassette transporter subfamily A, member 1*). Esse último é responsável pela saída do colesterol da célula e é crucial para a formação do HDL (141). Devido a regulação do ABCA1 pelo miR-33 há mudança no fluxo de colesterol em macrófagos de camundongo, sugerindo que a abordagem desse microRNA possa promover o transporte reverso de colesterol de macrófagos aterogênicos e diminuir a aterosclerose (141). Em modelos de camundongo a expressão do ABCA1 hepático e em macrófagos e os níveis circulantes de HDL aumentam com a inibição do miR-33a (147). Rayner *et al.* estudaram o impacto da inibição do miR-33 em camundongos deficientes do receptor de LDL, com placas de aterosclerose pré-estabelecidas. A inibição deste microRNA por quatro semanas resultou em aumento do HDL e diminuição das placas de aterosclerose, sugerindo um possível papel terapêutico para a DCV (148). Erhartova *et al.* estudaram a expressão do miR-33 em pacientes pós

transplante de fígado. Esse microRNA foi significativamente associado a esteatose hepática (146).

Ao estudar pacientes portadores de DHGNA Mehta *et al.* demonstraram níveis séricos diminuídos de miR-145 em pacientes obesos comparado a eutróficos (149). Esse microRNA está localizado no cromossomo humano 5 (150), aumenta a expressão da miocardina e está diretamente ligado a diferenciação da musculatura lisa do vaso (135). A formação da placa de ateroma e o fenótipo fisiológico da camada de músculo liso do vaso depende da correta expressão de vários microRNA, entre eles o miR-145 (136), e portanto o seu nível circulante difere em pacientes com doença arterial coronariana (150). Fichtlscherer *et al.* estudaram pacientes saudáveis e portadores de doença arterial coronariana, evidenciando nesses últimos diminuição da expressão do miR-145 (151). A expressão do miR-145 está desregulado em pacientes com infarto agudo do miocárdio, e a sua presença no sangue periférico se correlaciona com o tamanho do infarto (152). A HAS está relacionada a DCV, e a expressão de miR-145 está diminuído nesses pacientes (153). O miR-145 possui uma regulação positiva em pacientes portadores de angina instável (154).

2.8 Particularidades sobre os escores clínicos para cálculo do risco cardiovascular

O escore de risco de Framingham estima o risco em 10 anos de desenvolver a doença cardíaca coronariana em adultos sem DCV conhecida. Esse escore tem uma sensibilidade de 74-80% e um valor preditivo negativo de 93-97%, com uma precisão ainda incerta (12).

O ASCVD foi desenvolvido em 2013 e sua precisão e aplicabilidade em diferentes populações ainda está sendo estabelecida (155). Apesar dessa pontuação

englobar diferentes populações e etnias, sua aplicabilidade fora dos Estados Unidos ainda não foi estabelecida (156). Um estudo observacional relatou que ASCVD tem uma correlação com a gravidade da DHGNA, e o Framingham foi correlacionado com grau de fibrose hepática e estágio de esteatose. Adicionalmente, esse estudo sugere que o desenvolvimento e progressão da gravidade da DHGNA parece ser paralela ao aumento do RCV (116).

Uma coorte analisou 1.262 pacientes com DHGNA, sendo 47,9% homens, 41,2% brancos e a média de idade de 56,3 anos. Usando ASCVD, pacientes com alto RCV estiveram presentes em 55,9% da amostra, e fibrose avançada em 4,8%. Pacientes com alto RCV devido a ASCVD eram mais velhos (62,9 vs 48,8 anos), homens (61,2% vs 32,9%), negros não hispânicos (23,7 vs 17,1%), fumantes ativos (27,6% vs 12,8%) e hipertensos (37,2 vs 10,6%), além de possuírem um maior número de componentes da SM (obesidade, diabetes, hiperlipidemia), prevalência de fibrose hepática avançada e DRC (157).

O estudo de Motamed *et al.* (98) foi realizado com o objetivo de verificar a associação entre DHGNA (diagnosticada por ultrassom) e estimar o RCV em 10 anos por ASCVD e Framingham. Esse estudo foi conduzido com 2.804 indivíduos entre 40 e 70 anos. Através do ASCVD, o RCV médio em homens com DHGNA foi de 14,2%. A incidência de DCV aumenta com a maior prevalência de DHGNA. Os resultados demonstraram que 61,2% (IC 95%: 57,0 - 64,5%) dos homens com DHGNA e 51,7% (IC 95%: 48,4 - 55,0%) dos homens sem DHGNA possuíam um RCV em 10 anos \geq 7,5% usando o ASCVD e 70,4% (IC 95%: 67,3 - 73,4%) e 60,5% (IC 95%: 57,3 - 63,7%) usando o escore de Framingham, respectivamente. Em mulheres, 29,6% (IC 95%: 26,5 - 32,7%) dos pacientes com DHGNA e 20% (IC 95%: 16,6 - 23,4%) dos pacientes sem DHGNA tinham um RCV de 10 anos de \geq 7,5% usando ASCVD e

usando o Framingham essas proporções foram 40,9% (IC 95: 37,6 – 44,3%) e 20,8% (IC 95%: 17,3 – 24,2%) em mulheres com e sem DHGNA, respectivamente.

O objetivo do projeto SCORE é desenvolver sistemas de estimativa de risco de DCV aplicáveis a nível nacional em diferentes países europeus, este escore não é o melhor marcador de RCV e promove apenas a classificação em relação à classe de risco em pacientes acima de 40 anos de ambos os sexos (158). A relação entre um perfil lipídico aterogênico e TGLs plasmáticos elevados contribui para a progressão da aterosclerose (159).

Índice de risco Castelli (CRI)-I pode ser um melhor preditor de eventos cardiovasculares do que fatores de risco lipídicos individuais (160). Um estudo transversal com 699 participantes recrutados em comunidades semiurbanas na Nigéria demonstrou que o CRI-I previu uma maior prevalência de predisposição para RCV (47,8%). O Coeficiente aterogênico (CA) e CRI-II previram uma prevalência de RCV de 22,5% e 15,9%, respectivamente (161). Outro estudo incluiu 620 participantes, dos quais 290 eram pacientes com acidente vascular encefálico prévio e 330 voluntários saudáveis na Índia. CRI-I e CA foram fatores de risco significativos para o desenvolvimento de acidente vascular encefálico(162). Um estudo de caso-controle na população indiana conduzido com 60 pacientes com doença arterial coronariana confirmados angiograficamente encontrou um CRI-I superior a quatro e um CRI-II superior a três. Este estudo sugere que em pacientes com hipertrigliceridemia, o CRI-I se torna o principal preditor para o risco total de doença arterial coronariana, contribuindo com 20% na identificação de indivíduos em risco, seguido pelo CA com 16% e CRI-II com contribuição de 13% (163).

2.9 Tratamento do Risco Cardiovascular na Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica

O objetivo do tratamento da DHGNA é a redução da RI, do RCV, lesão em órgãos alvo, eventos relacionados e aumento da sobrevida (164). Pela relação entre DHGNA e DCV, o tratamento de pacientes portadores dessa primeira patologia objetiva a diminuição da mortalidade hepática e cardiovascular (165). Aconselhamento moderado a intenso quanto a atividade física e dieta em indivíduos portadores de fatores de RCV reduz os níveis séricos de CT, LDL, glicemia em jejum, pressão sanguínea e perda de peso, prevenindo a DCV (166). Perda de peso de 3-5% do peso corporal resulta em melhora da esteatose, mais de 5% melhora injúria celular hepática e inflamação, mais de 7% reduz atividade necro-inflamatória, e mais de 10% reduz fibrose (17). Entretanto, se essa redução de peso também está associada a uma redução do RCV ainda é incerto (110).

Atividade física afeta as comorbidades cardiometabólicas da DHGNA, como a RI, DSL e adiposidade visceral. Exercício físico de resistência, mesmo sem mudança de peso, reduz a esteatose hepática, melhora o controle glicêmico e a oxidação lipídica. Exercício físico de qualquer tipo ajuda a reduzir o risco de DCV, diminuir a liberação de espécies reativas de oxigênio e melhorar a disfunção endotelial (4, 18). O treinamento físico regular tem efeitos benéficos, incluindo aumento da capacidade oxidativa, melhora da função cardiovascular, melhora da homeostase glicêmica e oxidação de ácidos graxos (167). A ausência de atividade física é preocupante na atualidade, acompanhada do aumento da obesidade e sobrepeso. Um relatório que incluiu 1,9 milhões de participantes em 168 países sugeriu que as mulheres na

América Latina, sul da Ásia e países ocidentais de alta renda têm a maior prevalência de inatividade física (168).

A dieta é importante para a perda de peso e manejo da DHGNA (4). Um estudo randomizado em pacientes com DHGNA comprovou que a dieta mediterrânea, mesmo sem perda de peso, diminui esteatose hepática e melhora a RI (169).

Vitamina-E e pioglitazona foram analisados através do estudo PIVENS (do inglês *Pioglitazona versus vitamina-E versus placebo (PLA) para o tratamento de pacientes não diabéticos com esteatohepatite não alcoólica*) em pacientes portadores de EHNA e ausência de DM, com melhora da inflamação, balonização e esteatose, mas sem grande melhora na fibrose e na RI, provavelmente não tendo uma grande alteração do RCV nesses pacientes. Quanto aos efeitos colaterais o uso prolongado de vitamina E pode aumentar o risco de acidente vascular encefálico hemorrágico, e pioglitazona está ligado a ganho de peso e insuficiência cardíaca congestiva (170, 171). Há dados que sugerem que vitamina E pode ser benéfica no RCV relacionado à presença de polimorfismo da haptoglobina, com uma metanálise mostrando associação de vitamina E com menores taxas de eventos cardiovasculares (OR: 0,66, IC 95% 0,45-0,95; $p = 0,025$) (172).

Atualmente não há evidência de que o tratamento da DHGNA leve diretamente a redução do RCV. Portanto, o tratamento de cada condição clínica que ocasiona um aumento do risco cardiometabólico deve ser instituído de modo individualizado (19). Metformina é a primeira escolha para tratamento do DM-2, melhorando a RI, porém não há melhora quanto a histologia e esteatose hepática(170). Estatina é usada para prevenção primária de DCV, diminuindo mortalidade associada a doenças coronarianas. Estatina também exerce um fator protetor quanto a inflamação,

esteatose e avanço da fibrose (101, 173). O peptídeo semelhante a glucagon-1 (GLP-1, do inglês *glucagon-like peptide-1*) como liraglutida e semaglutida são usados no tratamento da DM-2 (174). O estudo LEAN avaliou os pacientes portadores de DHGNA em uso de liraglutida por 48 semanas, sendo demonstrada resolução da EHNA em relação ao PLA, com significativa melhora do peso, glicose e hemoglobina glicosilada (175). Semaglutida, medicamento do mesmo grupo do liraglutida, foi estudado em pacientes com EHNA sem cirrose com melhora quanto a resolução da EHNA. Houve diminuição do peso e sua relação foi dose dependente. Quanto aos eventos cardiovasculares durante o estudo, 3 pacientes tiveram eventos agudos, todos no grupo da semaglutida, porém o estudo relata que o seu objetivo não foi a análise de eventos cardiovasculares e nenhuma conclusão pode ser tomada devido ao pequeno número de eventos (176).

Ácido obeticolico é um derivado semi-sintético do ácido biliar e funciona como um agonista do receptor farnesóide X, sendo um regulador negativo da glicose hepática e do metabolismo lipídico (174), tendo portanto um potencial efeito sobre o RCV. O estudo FLINT, fase IIb em pacientes com EHNA sem cirrose, demonstrou haver melhora da fibrose, tendo como efeitos colaterais prurido, aumento do LDL e diminuição do HDL (177), efeitos negativos sobre o RCV. O estudo REGENERATE, randomizado, PLA controlado, fase III, irá analisar o efeito do ácido obeticolico quanto a melhora da EHNA e fibrose (178).

Elafibranor é um receptor dual ativado por proliferadores de peroxissoma alfa e gama. O estudo GOLDEN-505 estudou pacientes com EHNA. Houve melhora do perfil cardiometabólico dos pacientes, representada pela melhora do perfil lipídico (diminuição do TGL e LDL e aumento do HDL) e nos pacientes diabéticos melhora da

glicose, hemoglobina glicosilada e RI (179). Há um ensaio clínico de controle randomizado de fase III em andamento (NCT02704403) para avaliar o efeito de elafibranor em comparação com PLA na histologia hepática em sujeitos portadores de EHNA com fibrose, além de desfechos clínicos (todas causas de morte em um período de 4 anos). Selonsertibe (fibrose em ponte - STELLAR 3, NCT03053050 e cirrose compensada -STELLAR 4, NCT03053063) está em estudo para a melhora da doença hepática em pacientes com DHGNA.

Terapia combinada com alvo na inflamação e fibrose pode ser a estratégia mais efetiva com vistas a melhora dos resultados hepáticos e cardiovasculares (165), baseado no fato da complexa fisiopatologia da DHGNA (174). GS0976 (NCT02856555) e GS9674 (NCT02854605) estão sendo estudados para o tratamento de EHNA (164, 180). Tropifexor com cenicriviroc, um estudo de fase IIb está em andamento para avaliar desfechos relacionados apenas ao fígado em pacientes cirróticos com EHNA (181).

Com essa descrição dos estudos em andamento podemos ver que eles inicialmente não focam em desfechos cardiovasculares em pacientes portadores de DHGNA, tendo por vezes avaliações indiretas de seus parâmetros como antropometria e perfil glicêmico e lipídico.

2.10 Papel da Microbiota e dos Probióticos na Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica e no Risco Cardiovascular

2.10.1 Microbiota Intestinal

A microbiota é definida pela soma de todos os microrganismos que residem em um hospedeiro, incluindo não apenas bactérias, mas também arqueias, eucariotos e vírus (182). A estimativa de células microbianas no corpo humano é em torno de 10^{14} - 10^{15} bactérias, sendo a microbiota intestinal (principalmente o cólon) o principal contribuinte para essa população. Comparando o número de bactérias com o número de células nucleadas no corpo humano, encontramos uma razão de aproximadamente 1:1, com variações entre indivíduos (183). No que tange a obesidade, as medidas das concentrações bacterianas do cólon são semelhantes a do homem padrão para o cálculo da concentração bacteriana, indicando que a alteração no número total de bactérias é determinada pela alteração no volume do cólon (184).

A microbiota intestinal padrão é composta predominantemente de bactérias anaeróbicas, além das aeróbicas e anaeróbicas facultativa. Consiste em aproximadamente 500 a 1.000 espécies, pertencendo a apenas alguns dos filos bacterianos conhecidos (185). Aproximadamente 98% de todas as espécies de bactérias da microbiota intestinal pertencem ao filo *Firmicutes* (64%) e *Bacteroidetes* (23%), seguido pela *Proteobacteria* (8%) e *Actinobacteria* (3%). O filo *Firmicutes* contém mais de 250 gêneros, incluindo os *Lactobacillus* (186).

A capacidade metabólica e bioquímica da microbiota complementa a fisiologia do hospedeiro, sendo responsável pela digestão de polissacarídeos e produção de vitaminas essenciais, afeta as propriedades da camada de muco intestinal, promove

o desenvolvimento de estruturas linfoides, modula a ativação e a diferenciação de várias populações de linfócitos, equilibra a produção de imunoglobulina A, e é necessária para a produção de ácidos biliares secundários (182).

2.10.2 Eixo Intestino Fígado

O intestino e o fígado têm uma relação anatômica e funcional. Eles possuem uma comunicação bidirecional que ocorre através do trato biliar, veia porta e circulação sistêmica (187). O fígado se comunica com o intestino por meio da liberação de ácidos biliares e mediadores bioativos no trato biliar e na circulação sistêmica. No intestino a microbiota metaboliza ácidos biliares e aminoácidos, assim como substratos advindos da dieta e da exposição ambiental. Os produtos dessa metabolização entram em contato com o fígado através da veia porta, influenciando a função hepática (188).

O componente central da barreira intestinal são os enterócitos, que estão fortemente ligados através de desmossomos e junções aderentes (sendo a proteína caderina seu principal fator). Na face citoplasmática, caderinas se relacionam com as cateninas, aumentando a força dessa estrutura e formando as junções firmes. Na localização apical, também fazendo parte das junções firmes, estão as proteínas da *zonula occludens*, que interagem diretamente com as proteínas da junção transmembrana (como a claudina), com a ocludina e com o citoesqueleto de actina e

miosina. Essa barreira restringe o movimento de bactérias e moléculas do lúmen intestinal, permitindo um transporte seletivo e ativo de nutrientes (Figura-5) (189).

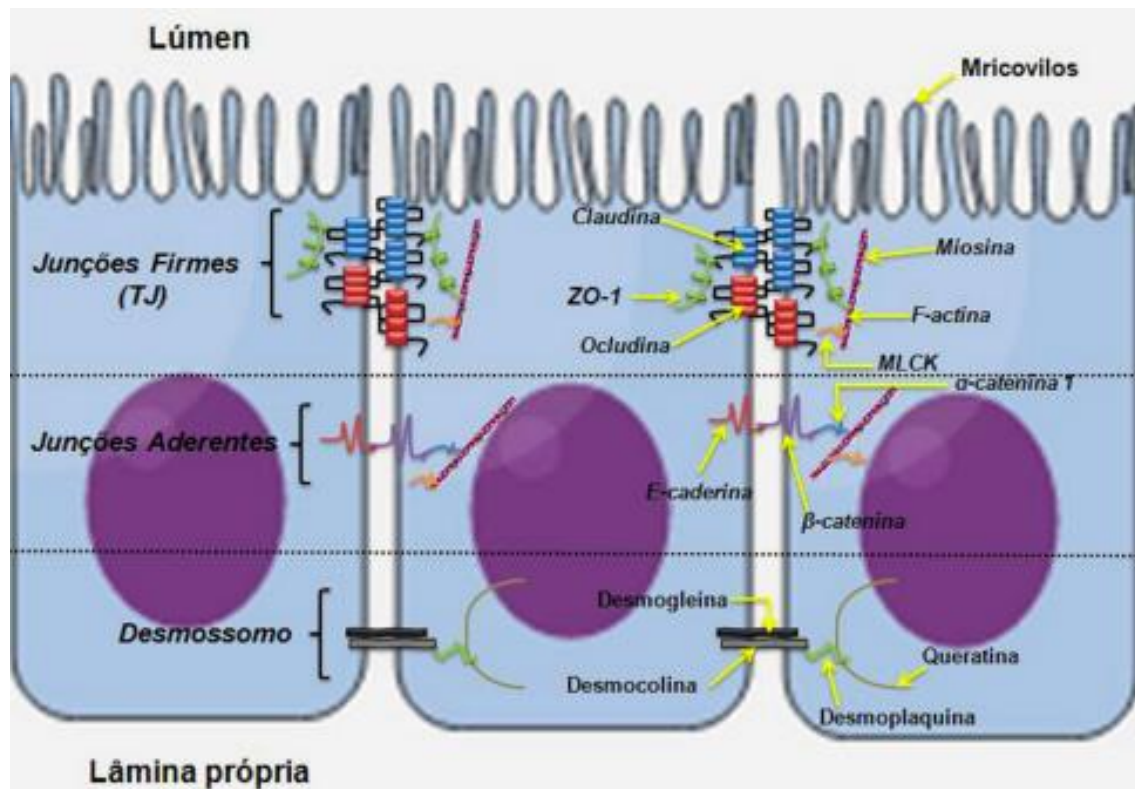


Figura 5: Componentes da barreira intestinal com os enterócitos, junções firmes e proteínas associadas. Os enterócitos são ligados por meio das junções firmes, formadas por claudinas, ocludinas e zonula occludens. As proteínas da junção aderente são formadas pelas caderinas e cateninas. Abreviaturas: MLCK: miosina quinase de cadeia leve, TJ: junções firmes, ZO-1: zonula occludens-1. Fonte: Rodrigues *et al.* (2016) (190).

Cerca de 70% do suprimento sanguíneo do fígado é proveniente da veia porta. A circulação sanguínea impede o fígado de interagir com as bactérias e seus produtos, configurando a barreira vascular intestinal (191). A injúria da barreira epitelial e vascular do intestino é um evento inicial para o desenvolvimento da EHNA, causado pela alteração da microbiota devido a uma dieta rica em gordura. Com a quebra da

barreira intestinal e vascular as bactérias e seus produtos pioram a inflamação da DHGNA (192).

2.10.3 Disbiose e Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica

A disbiose é definida pela perda do equilíbrio da microbiota intestinal (193). Uma dieta rica em gordura saturada causa o aumento da liberação de lipopolissacarídeos, um componente glicolipídico da parede celular de bactérias. Na circulação, esses componentes ativam a liberação de mediadores inflamatórios e induz a uma resposta inflamatória sistêmica. O excesso de lipopolissacarídeos na corrente sanguínea está presente em indivíduos obesos, e pode resultar de alterações da composição da microbiota intestinal e/ou aumento da permeabilidade da barreira intestinal (194).

A disbiose e o aumento da permeabilidade da barreira intestinal causam translocação de bactérias e seus produtos, incluindo componentes da parede celular, referidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen associated molecular patterns*) e padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs, do inglês *microbial associated molecular patterns*). Os PAMPs e MAMPs são reconhecidos pelos receptores imunes das células hepáticas, como as células de Kupffer e as células estreladas, as quais iniciam e mantêm a cascata inflamatória que leva à lesão hepática na forma de fibrose (188).

Caracterizando a disbiose dos pacientes portadores de EHNA, esses possuem maior número de *Bacteroides* e menor número de *Prevotella*, sendo que a abundância de *Bacteroides* é um fator independente associado à EHNA e a abundância de

Ruminococcus é um fator independente associado a fibrose ≥ 2 (195). Uma recente metanálise comprovou uma significativa associação entre supercrescimento bacteriano do intestino delgado (SIBO, do inglês *small intestinal bacterial overgrowth*) e DHGNA (22). O SIBO é caracterizado pelo excesso de bactérias aeróbicas e anaeróbicas nesse local, com crescimento bacteriano de $\geq 10^5$ unidades formadoras de colônia (UFC) por milímetro na cultura do aspirado jejunal, ou $\geq 10^3$ UFC por milímetro se há bactérias colônicas presentes. O SIBO provoca inflamação prolongada e aumento da permeabilidade intestinal (196). Esse último facilita o fluxo de produtos bacterianos para o sistema porta, causando mais hepatotoxicidade (22).

Obesidade reduz o movimento intestinal, aumentando o SIBO; também causa lesão da barreira intestinal, resultando em translocação bacteriana. A microbiota intestinal em pacientes obesos e portadores de DHGNA é responsável por uma absorção energética extra, produzindo ácidos orgânicos (ácidos graxos de cadeia curta) através da fermentação de substratos energéticos (fibras e polissacarídeos). Ácidos graxos de cadeia curta são responsáveis pela redução da motilidade intestinal (197). Uma relação clara foi demonstrada entre DM-2 e as mudanças de composição na microbiota intestinal, com uma abundância relativamente menor de *Firmicutes* e uma proporção maior de *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* em pacientes com DM-2 (198).

2.10.4 Probióticos na Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica/Esteato-Hepatite Não-Alcoólica e seu Papel no Risco Cardiovascular

A Organização das Nações Unidas e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura definiram como PROBs “microrganismos vivos que

quando administrados em quantidades suficientes conferem um benefício a saúde para o hospedeiro” (199).

Devido aos múltiplos mecanismos patológicos da DHGNA, a combinação de várias cepas de PROBs pode ser mais efetiva do que apenas uma (191). Os PROBs mais comuns são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Tornou-se aparente que os efeitos PROBs são específicos da cepa com efeitos particulares na saúde, como modulação imunológica, produção de compostos antimicrobianos ou a capacidade de reduzir o colesterol, por exemplo, presente em uma cepa e ausente em outra cepa, pertencendo até mesmo à mesma espécie (200).

A utilização de PROBs para o tratamento da DHGNA é promissora devido a sua disponibilidade, baixo custo e ausência de efeitos colaterais (201). PROBs supostamente agem em diferentes alvos: modificam a composição da microbiota intestinal possuindo um efeito antimicrobiano, reduzem as alterações na permeabilidade intestinal e a translocação dos produtos bacterianos para a circulação portal, e modulam as vias de inflamação hepática (197, 202). PROBs podem proteger a barreira intestinal: *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus* mantêm ou aumentam a proteção da barreira intestinal, modulando a função da actina, *zonula occludens* e ocludina (203). *Lactobacillus rhamnosus* pode prevenir a liberação de citocinas que induzem a apoptose das células epiteliais intestinais (204).

Sepideh *et al.* realizaram um ECR em pacientes portadores de DHGNA diagnosticados por ultrassonografia, utilizando sete cepas de PROBs por oito semanas, entre eles *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus* versus PLA. O estudo demonstrou melhora da glicemia, RI e IL-6 no grupo intervenção (25). Uma metanálise de quatro ECR duplo cegos mostrou que PROBs utilizados na

DHGNA/EHNA melhoraram o nível de ALT comparados com PLA. Três ECR dessa metanálise mostraram uma melhora do CT e AST com PROBs. Apenas dois ECR analisaram os efeitos dos PROBs na RI, mostrando uma melhora comparada com PLA. Todos esses achados foram estatisticamente significativos, e os estudos usados para cada um desses achados foram homogêneos entre si. Os quatro estudos utilizaram *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, porém com diferentes dosagens e tempo de tratamento (26). Uma revisão sistemática demonstrou que a maioria dos ECR utilizaram como PROBs *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, 77,8% das intervenções utilizaram múltiplas cepas, e o tempo médio de tratamento foi 13,1 semanas. Tratamento com PROBs reduziu discretamente e significativamente o IMC, níveis de enzimas hepáticas e canaliculares e melhora do perfil lipídico (com exceção do LDL) e glicêmico (glicose e insulina). Não houve diferença estatisticamente significativa na RI (23).

Duseja *et al.* (205) realizaram um estudo multicêntrico randomizado duplo cego com várias cepas de PROBs por 12 meses em 39 pacientes indianos portadores de DHGNA sem DM-2. Análise histológica dos pacientes antes do estudo evidenciou EHNA leve e ausência de fibrose na maioria dos seus pacientes, com nenhum paciente possuindo cirrose e com escore NAS maior ou igual a 5 em 8 pacientes do grupo PLA e 8 do grupo PROB. Foram utilizadas 675 bilhões de UFC contendo *Lactobacillus* das espécies *paracasei*, *plantarum*, *acidophilus* e *delbrueckii*; *Bifidobacterium* das espécies *longum*, *infantis* e *breve*; e *Streptococcus thermophilus*. Esse estudo comparou biópsia antes e depois da intervenção, mostrando a melhora significativa da balonização e fibrose. Os pacientes que fizeram uso do PROB tiveram uma redução significativamente maior da ALT e das citocinas inflamatórias em relação

ao PLA, ambos os grupos tiveram acompanhamento e tratamento de suas comorbidades (obesidade, HAS e DSL) e melhora da dieta e atividade física.

Khan *et al.* (206) incluíram 12 ensaios clínicos randomizados para análise. A intervenção, que compreendia o braço PROB e/ou simbiótico, mostrou uma melhora significativa nos níveis séricos de ALT e AST. Adicionalmente, houve uma redução nos níveis séricos de PCR no braço de intervenção. Aller *et al.* (207) em um estudo duplo-cego analisaram o efeito de PROB por três meses, fazendo uso de 500 milhões de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* por dia em 30 pacientes com DHGNA comprovada por biópsia. No grupo PROB, houve uma diminuição das transaminases e enzimas canaliculares e no grupo PLA não houve alteração nesses valores. Os parâmetros cardiovasculares (glicemia, colesterol, HOMA-IR) e variáveis antropométricas permaneceram inalteradas em ambos os grupos.

Uma revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados (27) examinou o efeito dos PROBs na redução dos componentes lipídicos e dos fatores de risco coexistentes associados às DCVs. Efeitos agrupados estatisticamente significativos no grupo PROB foram encontrados na redução do CT, LDL, IMC, circunferência abdominal e marcadores inflamatórios (PCR e TNF- α). A análise de subgrupo revelou efeitos estatisticamente significativos dos PROBs no CT e LDL quando o meio era leite fermentado ou iogurte ($p < 0,001$) em comparação com a forma de cápsula, quando o consumo durou pelo menos oito semanas ($p < 0,001$) e os PROBs consistiam em múltiplas cepas ($p < 0,001$) em vez de uma única cepa. Uma redução significativa foi encontrada nos níveis de LDL em ensaios que continham a cepa de *Lactobacillus acidophilus* ($p < 0,001$) em comparação com outros tipos de cepas. Isso pode-se se justificar pelo fato de o *Lactobacillus acidophilus* poder passar

pelo trato digestivo intacto e vivo em comparação com outras cepas, otimizando assim seu nível de atividade no intestino grosso (27). Um artigo de revisão de ensaios clínicos randomizados sobre prebióticos, PROBs e simbióticos (208) demonstrou alterações não significativas ou pequenas, clinicamente irrelevantes no peso corporal, pressão arterial, hemoglobina glicosilada e outros biomarcadores, incluindo circunferência abdominal, gordura visceral, taxa metabólica basal, perfil lipídico, HOMA-IR, índice de sensibilidade à insulina e inflamação (PCR, IL-6 e TNF- α).

O estudo de Manzhali *et al.* (209) avaliou 75 pacientes diagnosticados com EHNA sem biópsia (diagnosticados por exame de imagem e alteração de enzimas hepáticas), comparando o uso de PROBs e PLA por 12 semanas. Uma diminuição discreta, porém, significativa, foi observada no IMC e CT no grupo PROB comparado com o controle, e a composição da microbiota intestinal em pacientes tratados com PROBs demonstrou uma mudança para um padrão normal para todas as espécies de bactérias analisadas. No estudo de Ferolla *et al.* (210) cinquenta pacientes portadores de EHNA comprovados por biópsia foram randomizados entre PLA e simbiótico, com a maioria dos pacientes em ambos os grupos possuindo doença hepática leve. Parâmetros metabólicos foram avaliados, sem nenhum outro marcador relacionado ao RCV. Após a intervenção, apenas o grupo dos simbióticos apresentou redução na perda de peso, diminuição do IMC e circunferência abdominal, apesar de todos esses parâmetros terem diminuído em menos de 2%. No estudo de Wong *et al.* (211) pacientes portadores de EHNA comprovados por biópsia foram randomizados para receber PROBs (múltiplas cepas de 200×10^6 UFC) (10 pacientes) ou nenhuma medicação (10 pacientes) por seis meses. Parâmetros metabólicos foram avaliados, sem nenhuma outra avaliação do RCV. O uso de PROBs não foi associado a

mudanças no IMC, circunferência abdominal, perfil glicêmico e lipídico. Não houve descrição das características histológicas dos pacientes.

Estudos experimentais têm demonstrado que a transferência de microbiota fecal pode induzir a doenças metabólicas e obesidade, indicando que a microbiota intestinal possui uma relação íntima com processos fisiológicos de mamíferos ligados ao risco de desenvolver DCV (200, 212). Aterosclerose está intimamente ligada a DCV, estando associada a alterações metabólicas e lipídicas. PROBs como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* reduzem os níveis séricos de colesterol através da produção de ácidos biliares (213). Uma metanálise evidenciou que a utilização de PROBs promove a diminuição dos níveis de CT e LDL, podendo portanto reduzir a morbidade das DCV (214). Em outra metanálise foi demonstrado resultados semelhantes, evidenciando também melhora do IMC e circunferência abdominal, fatores associados ao desenvolvimento da DCV, nos pacientes submetidos a PROBs. Uma redução significativa nos níveis de LDL foi obtida em estudos que utilizaram *Lactobacillus acidophilus* (27).

Em um estudo em modelo experimental, foi demonstrado que a utilização de *Lactobacillus rhamnosus* em ratos submetidos a oclusão da artéria coronariana promoveu a diminuição da hipertrofia cardíaca, disfunção do ventrículo esquerdo, e melhora da função sistólica e diastólica (215). Em outro estudo, no qual indivíduos portadores de insuficiência cardíaca (fração de ejeção < 50%) foram randomizados para receber *Saccharomyces boulardii* ou PLA por três meses, foi demonstrado que a utilização do PROB promoveu a redução no diâmetro do átrio esquerdo, e dos níveis de PCR e creatinina, sem evidência de efeitos colaterais (216).

A disfunção endotelial está diretamente ligada a DCV. Estudo realizado com 20 homens portadores de doença arterial coronariana demonstrou que a suplementação com *Lactobacillus plantarum* melhorou a função vascular endotelial (217). Um ECR duplo cego em mulheres obesas pós menopausa, utilizando PROBs de várias cepas (entre elas *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*) por 12 semanas demonstrou melhora na pressão arterial sistólica e fator de crescimento endotelial vascular, os quais são parâmetros funcionais e bioquímicos de disfunção endotelial (218). *Lactobacillus plantarum* foi utilizado por seis semanas em um ECR duplo cego com pacientes de alta carga tabágica. A utilização do PROB foi responsável por diminuir a pressão arterial sistólica, os níveis de LDL e fibrinogênio, comparado ao grupo controle (219). Em uma metanálise foi demonstrado que o uso de PROBs reduziu o nível de infiltração gordurosa hepática de uma forma estatisticamente significativa, com heterogeneidade entre os estudos (23). Deposição hepática gordurosa está relacionada a comprometimento cardíaco e alteração na função autonômica. Essa última predispõem a arritmias cardíacas e doença arterial coronariana (220).

Bock *et al.* (221) realizaram uma revisão sistemática e metanálise de ECR controlados estudando o efeito da suplementação de PROBs, prebióticos ou simbióticos na microbiota intestinal, no controle da glicose e nos níveis de lipídios em indivíduos com DM-2. Não houve redução significativa nos níveis de hemoglobina glicosilada e nos níveis de LDL. No entanto, em um dos quatro estudos, houve uma diminuição discreta e significativa dos níveis séricos de glicose, CT, TGLs e uma diminuição nos níveis de insulina e aumento de HDL. O estudo de acompanhamento mais longo foi de 12 semanas.

Dixon *et al.* (222) publicaram uma metanálise sobre o efeito dos PROBs em resultados associados a RCV e DCV (HAS, sobrepeso, perfil lipídico e glicêmico). Efeitos significativos foram encontrados na redução da pressão diastólica e sistólica, CT, LDL, glicemia, hemoglobina glicosilada e IMC, além de aumento no HDL, com melhores resultados relacionados a duração de tratamento acima de 1,5 meses, uso de formulações alternativas (kefir e pó), maior dosagem de PROB (acima de 1×10^9 UFC), pacientes diabéticos e sexo feminino.

Zhang *et al.* (223) publicaram uma metanálise de coortes sobre alimentos lácteos fermentados e DCV usando o *Pubmed* e uma base de dados chinesa. Diminuição significativa de DCV foi associada a alimentos lácteos fermentados (OR 0,83, IC 95% 0,76 – 0,91), como o queijo e o iogurte.

Não há metanálise específicas relacionando PROBs e RCV na DHGNA, o que demonstra o fato de que faltam estudos sobre esses temas. Uma procura na base de dados do *PubMed* resulta em seis estudos quando se usa os termos “*NASH*” AND “*NAFLD*” AND “*probiotic*” AND “*cardiovascular risk*”. Há desenho de dois estudos: o estudo INSYTE (224) com uso de simbiótico em pacientes com DHGNA (documentado por exames de imagem ou biópsia) sobre marcadores hepáticos e de RCV (antropometria, perfil lipídico e glicêmico, espessura da camada média-íntima da carótida, velocidade da onda de pulso, gasto de atividade física, aptidão cardiorrespiratória, força do aperto de mão, fluxometria laser doppler); e o PROBILIVER (225), relacionado ao nosso grupo de pesquisa e a essa tese. O estudo de Fan *et al.* (226) é uma revisão sobre o papel da dieta na DHGNA, abordando brevemente os PROBs, sem relatar efeitos cardiovasculares. Federico *et al.* (227) publicaram um estudo concluindo após uma revisão do Cochrane que pela ausência

de ECR o uso de PROBs não é recomendado para EHNA; não foi abordado RCV. Ferro *et al.* (228) aborda o papel do estresse oxidativo (descrito como sendo super expresso em DCV) e lipopolissacarídeos derivados do intestino na patogênese da DHGNA. O outro trabalho é um artigo russo de revisão sobre terapia hipolipemiante e drogas que melhorem a flora intestinal e seus efeitos cardiovasculares em pacientes com DHGNA e EHNA (229).

3. JUSTIFICATIVA

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é a maior causa de doença hepática crônica nos países ocidentais. O principal fator de risco associado ao óbito nesta condição clínica é a doença cardiovascular (DCV). Tanto a DHGNA como a DCV têm relação com inflamação sistêmica, e a disbiose intestinal deve desempenhar um papel importante em ambas. Apesar disso, os desfechos principais nos estudos de DHGNA ainda são os hepáticos, e o risco cardiovascular (RCV) e a DCV não recebem a devida atenção. Provavelmente isso ocorre porque a DHGNA, embora seja uma doença sistêmica, seja avaliada de forma compartimentalizada pelos vários especialistas que a enfrentam. Assim, hepatologistas pensam sobretudo no fígado, endocrinologistas focam no controle do DM-2 e da dislipidemia, e cardiologistas na hipertensão e na DCV, porém, com exame limitado da doença hepática, o que prejudica o entendimento dos resultados da maior parte dos estudos. A avaliação da DCV em uma população de risco por certo exige um tamanho amostral significativo e um tempo de acompanhamento longo, o que é um empecilho à realização de bons estudos na área. Ademais, estudos epidemiológicos ainda faltam na DHGNA. Não obstante, a estimativa do RCV é uma tarefa simples e pode ser feita de maneira sistemática e com boa reprodutibilidade.

Vários estudos já foram publicados em relação ao papel dos probióticos (PROBs) no RCV, mas mesmo metanálises trazem resultados conflitantes. Por outro lado, inexistem estudos avaliando o papel dos PROBs no RCV em pacientes com DHGNA.

Em vista disso, são a importância clínica da DHGNA, o relevante papel da DCV em seu curso, a controvérsia quanto ao papel protetor dos PROBs no RCV e a falta

de evidências de seu uso na DGHNA, muito especialmente em população com esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA) comprovada por biópsia, que justificam este estudo.

4. QUESTÃO DA PESQUISA

1) O uso de probióticos pode modular a microbiota de pacientes com doença hepática gordurosa não-alcoólica e reduzir os marcadores de risco cardiovascular nesta população?

5. HIPÓTESE

1) O uso de probióticos, através da modulação da microbiota, pode ser útil na redução dos marcadores de risco cardiovascular em pacientes com doença hepática gordurosa não-alcoólica.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da suplementação com probióticos durante o período de 24 semanas nos marcadores de risco cardiovascular em pacientes com esteato-hepatite não-alcoólica confirmada por biópsia.

6.2 Objetivos Secundários

1) Avaliar o impacto do uso de probióticos sobre a concentração sérica de citocinas inflamatórias e marcadores de dano endotelial em pacientes com esteato-hepatite não-alcoólica;

2) Avaliar o impacto do uso de probióticos sobre a expressão sérica de microRNAs em pacientes com esteato-hepatite não-alcoólica;

3) Avaliar se o uso de probióticos é capaz de reduzir escores de risco cardiovascular em pacientes com esteato-hepatite não-alcoólica;

4) Avaliar se o uso de probióticos é capaz de alterar a composição metagenômica da microbiota intestinal em pacientes com esteato-hepatite não-alcoólica;

5) Correlacionar a composição da microbiota intestinal com os marcadores de risco cardiovascular em pacientes com esteato-hepatite não-alcoólica.

7. ARTIGO EM INGLÊS

8. CONCLUSÕES

1) Não houve diferença em relação à concentração sérica de citocinas inflamatórias e marcadores de dano endotelial em pacientes com esteato-hepatite não-alcoólica submetidos a tratamento com probióticos ou uso de placebo;

2) Não houve diferença significativa entre probióticos e placebo na expressão sérica de microRNAs na população estudada;

3) Não houve diferença significativa entre probióticos e placebo na redução dos escores de risco cardiovascular;

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Ensaio clínico randomizado (ECRs) são considerados referência na pesquisa clínica, trazem os níveis de evidências mais altos que podem advir de um estudo individual e formam a base de revisões sistemáticas e metanálise de alta qualidade. O estudo aqui apresentado foi um ECR, duplo-cego, controlado com placebo. Ele atende à expectativa dos critérios de adequação de um ECR quanto à geração de sequência aleatória e ocultação de alocação, pois foi realizado através de um programa on-line de randomização (viés de seleção). A randomização, por sua vez, foi bloqueada (restrita) para gerar uma sequência para garantir a mesma proporção de participantes nos grupos de intervenção e PLA. Ocorreu mascaramento de participantes e da equipe de pesquisadores (viés de desempenho) e cegamento da avaliação de resultados (viés de detecção). Todos os envelopes eram opacos, de igual aparência, numerados sequencialmente, lacrados com um selo à prova de falsificação e abertos somente após o envelope ter sido irreversivelmente atribuído ao paciente. Quanto aos dados de resultados incompletos (perdido) ocorreu a perda de acompanhamento de um paciente em cada grupo durante o estudo. Assim, pode-se inferir que foi um ECR de boa qualidade. O desenho do estudo foi publicado na revista *Trials*, em 2019 (225).

O cálculo do tamanho amostral no presente estudo foi baseado em artigo que avaliou melhora da fibrose hepática não por biópsia, mas por um método não-invasivo, o FibroScan®, em pacientes com EHNA em uso de simbióticos. Dessa forma, o cálculo não foi baseado em estimativa de RCV, o que pode gerar alguma censura. Entretanto, a ausência de estudos prévios com probióticos na avaliação do RCV em pacientes com DHGNA, e mais especificamente ainda, na EHNA, permite que seja

estudada uma amostra de conveniência, como feito neste caso. Contudo, há de se comentar que provavelmente a inclusão da forma como feita impactou na diferença significativa encontrada entre os grupos na história de eventos cardiovasculares prévios. Como havia mais pacientes com eventos prévios alocados para o uso de placebo, isso pode ter trazido algum viés, mesmo com os ajustes no momento do cálculo estatístico.

Este estudo avaliou pacientes portadores de DHGNA que foram incluídos após a verificação da presença de EHNA na biópsia hepática, o que traz a ele um diferencial positivo, posto que cada vez mais são utilizados marcadores não-invasivos na avaliação da DHGNA, que, se mais práticos, impactam negativamente na avaliação dos resultados, em especial quando se fala de EHNA. Não foram utilizados neste estudo os critérios de MAFLD (do inglês, *metabolic associated fatty liver disease*). Em que pese o risco de crítica pelo uso de uma nomenclatura que alguns possam considerar obsoleta, por outro lado isso deixa claro que está sendo avaliado o uso de PROBs em pacientes com DHGNA pura, o que ainda não havia sido feito em relação ao RCV. Por certo, estudar o mesmo desfecho em pacientes com MAFLD será útil.

A DCV é a causa mais comum de morte na DHGNA e é muito necessário que mais estudos avaliem tanto a sua frequência quanto o próprio RCV a fim de que se possa reduzir sua ocorrência nesta população. Neste estudo foi feita uma extensa avaliação de marcadores de RCV, incluindo citocinas inflamatórias, moléculas de adesão endotelial e microRNAs, além dos escores clínicos. Os resultados foram negativos, mas chama atenção o fato de que houve redução significativa nos níveis de PAI-1 e na expressão de miR-122, que são de certa forma consistentes com redução do RCV. A redução, no entanto, ocorreu nos grupos PROBs e PLA, e talvez

indiquem que em pacientes com DHGNA o simples acompanhamento clínico possa ter algum impacto no RCV.

A microbiota intestinal exerce papel determinante na DHGNA e também na DCV. Neste estudo o uso de PROBs por 24 semanas não foi capaz de alterar a composição metagenômica da microbiota intestinal. Esse achado não é de todo surpreendente, dadas algumas características da microbiota humana, como estabilidade e resiliência. Provavelmente a intervenção seja pouco significativa do ponto de vista temporal, e talvez em qualidade, para induzir o mecanismo de plasticidade e adaptabilidade que ocorre nos seres humanos. São poucos os ECR que avaliaram a microbiota intestinal antes e depois da suplementação com PROBs, e a maior parte deles mostra que não há alteração em sua composição com o uso dos mesmos (230-232).

A pandemia de COVID-19 não interferiu na coleta de dados deste estudo, uma vez que o acompanhamento dos pacientes foi concluído antes do mês de março deste ano. No entanto, a análise dos dados foi impactada pelo fechamento temporário de vários laboratórios. Dentre os principais resultados ainda superficialmente analisados está a avaliação da microbiota intestinal e sua correlação com os marcadores de RCV. Várias perguntas ainda restam sem resposta, em função do contingenciamento associado à pandemia, como a interação entre a composição e a diversidade da microbiota intestinal nos níveis de PAI-1, miR-122, VCAM-1, ICAM-1 e p-selectina, assim como dados relacionados à predição metabólica da microbiota intestinal.

Este estudo, por fim, considerando suas forças e limitações, é original em mostrar que o uso de PROBs não impacta no RCV de pacientes com DGHNA, mais especificamente, pacientes com EHNA demonstrada por biópsia. Estudos em

população de pacientes com EHNA mais graves, com fibrose mais significativa, com tamanho amostral maior e uso de PROBs por um período mais longo talvez possam ser interessantes para atestar a utilidade desta intervenção nos marcadores de RCV. Contudo, estudos com PROBs em humanos padecem de alguns problemas que talvez sejam de difícil solução, entre eles a falta de padronização entre as cepas, a dificuldade em estabelecer uma dose adequada, bem como determinar o tempo de uso mais conveniente. É provável que o desenvolvimento de drogas mais efetivas para o tratamento da DHGNA, o que se espera ocorrer até o final desta década, contribua para que tenhamos menor necessidade de tratamentos alternativos no futuro.

10. ANEXOS

Anexo 1: Ensaios clínicos randomizados na doença hepática gordurosa não alcoólica e seus objetivos cardiovasculares e hepáticos, no último ano.

Autor, ano	Intervenção	Objetivo: desfecho hepático	Objetivo: desfecho cardiovascular	Resultado
Abdelbasset <i>et al.</i> , 2020 (233)	Exercício intervalado de alta intensidade vs intensidade contínua moderada por 8 semanas em pacientes obesos diabéticos portadores de DHGNA	Avaliação sobre os triglicerídeos hepáticos e lipídeos viscerais	Avaliação da adiposidade visceral	Ambos os grupos de exercício mostraram uma redução significativa na gordura hepática e lipídeos viscerais, enquanto o grupo controle não apresentou diferença estatisticamente significativa
Draz <i>et al.</i> , 2020 (234)	Eletroacupuntura vs treinamento intervalado aeróbico por 6 semanas em pessoas portadoras de DHGNA	Avaliação alanina e aspartato aminotransferase	Avaliação peso, índice de massa corporal, triglicerídeos, proteína C reativa	Ambas as intervenções apresentaram melhoras nos triglicerídeos, proteína C reativa, transaminases, com quedas maiores no grupo da eletroacupuntura. Quanto a diferença entre os dois grupos o único marcador sem diferença estatisticamente significativa foi a proteína C reativa

Dong <i>et al.</i> , 2020 (235)	Eletroacupuntura com controle do estilo de vida vs grupo controle por 12 semanas	Avaliação da esteatose e enzimas hepáticas	Avaliação do metabolismo glicolipídico, resistência insulínica e parâmetros antropométricos (peso, índice de massa corporal, percentual de gordura, circunferência da cintura e do quadril)	Melhora do perfil hepático (esteatose e enzimas hepáticas), perfil glicolipídico, resistência insulínica, circunferência do quadril e relação cintura quadril
Okour M <i>et al.</i> , 2019 (236)	GSK3008356 (inibidor seletivo da diacilglicerol aciltransferase 1)	Não abordado	Desenvolvimento de um modelo farmacocinético-farmacodinâmico populacional que caracterize o uso do medicamento e sua alteração com o nível de triglicerídeo sanguíneo	A análise atual apresenta uma estratégia de modelagem farmacocinética-farmacodinâmica de dados de triglicerídeos com variação no tempo, provenientes de fontes endógenas e exógenas
Shimizu <i>et al.</i> , 2019 (237)	Cinco miligramas de dapaglifozina ou placebo por 24 semanas em pacientes com DHGNA e DM-2	Investigação do uso da dapaglifozina na esteatose hepática e fibrose	Avaliação da hemoglobina glicosilada e tecido adiposo visceral	Melhora significativa da esteatose hepática, peso, tecido adiposo visceral

Saadati <i>et al.</i> , 2019 * (238)	Suplementação de curcumina ou placebo por 12 semanas associado a mudança do estilo de vida em pacientes com DHGNA (por método de imagem)	Avaliação de características hepáticas: da esteatose e fibrose hepática	Avaliação dos índices inflamatórios: fator de necrose tumoral alfa, índice de massa corporal, proteína C reativa, fator nuclear kappa B	Intervenção esteve associada a queda fibrose hepática, fator nuclear kappa B, mas sem significância estatística entre os dois grupos
Mirhafez <i>et al.</i> , 2019 (239)	Cápsulas de curcumina (50 mg/dia) ou placebo por 8 semanas em pacientes com DHGNA (ultrassonografia)	Avaliação de enzimas hepáticas e canaliculares	Avaliação dos níveis de adiponectina e leptina, além de perfil lipídico, glicêmico e antropométrico	Diminuição significativa da leptina e aumento significativo da adiponectina
Ghaffari <i>et al.</i> , 2019 (240)	Açafrão (<i>Curcuma longa</i> L.) e semente de chicória (<i>Cichorium intybus</i> L.) por 12 semanas	Enzimas hepáticas e canaliculares	Avaliação dos padrões antropométricos, recordatório alimentar, atividade física, perfil lipídico, enzimas hepáticas	Combinação das duas intervenções diminuiu o nível sérico de fosfatase alcalina, com aumento da lipoproteína de alta densidade e a razão triglicerídeo/ lipoproteína de alta densidade e lipoproteína de baixa/alta densidade

Maleki <i>et al.</i> , 2019 (241)	Uso de leite de soja ou controle em pacientes com DHGNA (ultrassom) por 8 semanas	Avaliação da esteatose hepática	Avaliação do perfil glicêmico, resistência insulínica, fibrinogênio, índice de massa corporal	Insulina, resistência insulínica e pressão arterial sistólica e diastólica significativamente menor no grupo intervenção
Chen Y <i>et al.</i> , 2019 * (242)	Efeito de iogurte tradicional (220 gramas) vs leite em mulheres obesas com síndrome metabólica e DHGNA (ultrassonografia) por 24 semanas	Resposta de iogurte sobre a gordura hepática	Resposta de iogurte à resistência insulínica, microbiota intestinal e padrões bioquímicos de inflamação e estresse oxidativo (fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1 beta, interleucina 6, adiponectina, proteína C reativa, fator de crescimento de fibroblasto 21)	logurte significativamente diminuiu a resistência insulínica, esteatose hepática, TGL, CT, fator de necrose tumoral, fator de crescimento de fibroblasto. logurte significativamente diminuiu a abundância de <i>Firmicutes</i> , <i>Clostridia</i> , <i>Erysipelotrichia</i> , <i>Eubacterium ventriosum</i> e <i>Ruminococcus</i> ; e significativamente aumentou a abundância <i>Negativicutes</i> , <i>Selenomonadales</i> , <i>Acidaminococcaceae</i> , e <i>Phascolarctobacterium</i>
Traussnigg <i>et al.</i> , 2019 (31)	Ácido norursodeoxicólico vs placebo	Alteração percentual relativo médio na alanina aminotransferase, outros testes hepáticos e esteatose hepática	Não avaliado	Dose dependente em relação a diminuição da alanina aminotransferase – efeito significativo na dose de 1500mg

Marin-Alejandro <i>et al.</i> , 2019 (243)	Efeito de duas dietas personalizadas com restrição de energia (mediterrânea e composta de macronutrientes, carne, fibras, alimentos antioxidantes)	Avaliação hepática (ultrassonografia, ressonância magnética, elastografia, transaminases)	Avaliação do padrão corporal, antropometria, perfil lipídico e glicêmico, adiponectina, leptina, proteína C reativa, resistência insulínica	Ambos os grupos dietéticos melhoraram significativamente seus marcadores metabólicos e hepáticos após a intervenção, sem diferenças significativas entre eles
Harrison <i>et al.</i> , 2019 (244)	Resmetirom por 36 semanas: um agonista β -receptor seletivo do hormônio da tireoide, projetado para melhorar a DHGNA, aumentando o metabolismo da gordura hepática e reduzindo a lipotoxicidade	Alteração da gordura hepática medida por ressonância magnética, alanina aminotransferase, efeito na histologia hepática, biomarcadores de inflamação e fibrose,	Avaliação do perfil lipídico após intervenção	Pacientes submetidos à intervenção tiveram uma redução relativa do conteúdo de gordura hepática
Sangsefidi <i>et al.</i> , 2019 * (245)	Extrato padronizado de 320mg de frutos de cerejeira corneliana à	Avaliação da função hepática, alanina e aspartato	Avaliação creatinina quinase 18, fator de necrose	Estudo em andamento

	base de antocianina - <i>Cornelian cherry (Cornus mas L.)</i> por 12 semanas	aminotransferases, esteatose, fibrose	tumoral alfa, malonaldeído, adiponectina	
Rahmanabadi <i>et al.</i> , 2019 (246)	Ácido alfa lipóico ou placebo por 12 semanas em pacientes obesos; avaliação quanto a dieta em todos os pacientes	Efeito na esteatose, enzimas e marcadores histológicos hepáticos	Efeito na adiponectina, resistina, irisina, resistência insulínica, medidas antropométricas, diário alimentar	Melhora do nível de insulina, adiponectina, leptina e resistência insulínica no grupo intervenção
Younossi <i>et al.</i> , 2019 (30)	Estudo fase 3 com ácido obeticólico - estudo em andamento. Pacientes não cirróticos em pacientes portadores de EHNA	Avaliação da histologia hepática (fibrose, esteato-hepatite) e bioquímica hepática – melhora da fibrose (≥ 1 estágio) sem piora da EHNA ou resolução EHNA sem piora da fibrose	Não avaliado	Ácido obeticólico 25 mg melhorou significativamente a fibrose e os principais componentes da atividade da EHNA
Sanyal <i>et al.</i> , 2019 (247)	Pegbelfermina, um análogo do fator de crescimento 21 de	Alteração na gordura hepática medida por ressonância magnética	Mudança na composição corporal, perfil lipídico e glicêmico, adiponectina,	Redução na fração absoluta de gordura hepática no grupo recebendo 10mg dia e 20mg semanal da intervenção

	fibroblastos humanos PEGuilado	e marcadores de EHNA	peso, circunferência da cintura	
Navarro <i>et al.</i> , 2019 (248)	Altas doses de silimarina em pacientes não cirróticos portadores de EHNA por 48 semanas	Redução no NAS em no mínimo 2 pontos, redução da fibrose hepática, redução da alanina e aspartato aminotransferase em 50%	Redução da resistência insulínica	Sem resultados conclusivos. Altas doses de silimarina foram seguras e bem toleradas
Oliveira <i>et al.</i> , 2019 (29)	N acetilcisteína em combinação com metformina e/ou ácido ursodesoxicólico para tratamento de EHNA por 48 semanas	Avaliação da fibrose hepática e do NAS	Não avaliado	Na análise intragrupo (intenção de tratar), comparando características histológicas e bioquímicas, houve melhorias significativas no <i>NAFLD activity score</i> (grau de esteatose e balonização) e nos níveis de alanina aminotransferase no grupo N-acetilcisteína e metformina
Bomhof <i>et al.</i> , 2019* (249)	Uso de placebo ou oligofrutose prebiótico 8 gramas por 12 semanas seguido de 16 gramas por 24 semanas.	Mudança no NAS	Alteração no peso e composição corporal, tolerância a glicose, padrão inflamatório (fator de necrose tumoral alfa,	Diminuição significativa do escore NAS no grupo prebiótico. Aumento significativo no grupo prebiótico de <i>Bifidobacterium</i> e diminuição de <i>Clostridium</i>

	Pacientes possuíam a EHNA confirmados por biópsia		interleucina 6 e microbiota intestinal)	
Bril <i>et al.</i> , 2019 (250)	Vitamina E sozinha ou combinada com pioglitazona em pacientes portadores de diabetes e EHNA por 18 meses	Redução em dois pontos do escore NAS em dois parâmetros diferentes, sem piora da fibrose. Resolução da EHNA sem piora da fibrose. Avaliação de escores histológicos. Avaliação da gordura hepática	Avaliação do perfil metabólico: lipídico, glicêmico, resistência insulínica, adiponectina	Melhora da histologia no tratamento combinado, com exceção da fibrose
Federico <i>et al.</i> , 2019 * (251)	Efeito de silibin e vitamina E e D por 6 meses	Avaliação dos marcadores de doença hepática gordurosa não alcoólica (FIB4, NAS e elastografia)	Avaliação dos marcadores metabólicos, estresse oxidativo, disfunção endotelial – resistência insulínica, fator de necrose tumoral alfa, fator de crescimento transformador	Pacientes submetidos à intervenção sofreram uma melhora estatisticamente significativa nos marcadores metabólicos, estresse oxidativo, disfunção endotelial. Resultados ainda mais relevantes foram obtidos para os mesmos parâmetros analisando pacientes

			beta, interleucina 18 e 22, metaloproteinase de matrix-2, receptor de fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de insulina-dois, cluster de diferenciação-44, grupo de alta mobilidade box-1, endocan.	com diagnóstico concomitante de síndrome metabólica
Darand <i>et al.</i> 2019 (252)	Modificação do estilo de vida mais 2 gramas dia de semente preta ou placebo	Avaliação da esteatose hepática	Efeito da semente preta (<i>Nigella sativa</i>) em fatores de risco cardiovascular em pacientes com DHGNA	Redução na glicose, insulina, resistência insulínica, e aumento no índice de verificação quantitativa de sensibilidade à insulina comparado ao placebo. Diminuição maior do percentual de esteatose hepática no grupo intervenção.
Cai <i>et al.</i> , 2019 (253)	Jejum em dias alternados vs grupo controle entre 4 a 12 semanas de estudo	Não avaliado	Avaliar a intervenção no peso corporal e perfil lipídico em pacientes portadores de DHGNA	Redução do peso e colesterol total no grupo intervenção

Darand, <i>et al.</i> , 2019 (254)	Quatro cápsulas contendo <i>Nigella sativa</i> (500mg) ou placebo por 4 semanas. DHGNA (FibroScan)	Avaliação da fibrose e esteatose hepática	Avaliadores dos biomarcadores inflamatórios: fator de necrose tumoral alfa, proteína C reativa, fator nuclear kappa B. Parâmetros antropométricos.	Diminuição no grupo intervenção do fator de necrose tumoral.
Cheraghpour <i>et al.</i> , 2019 (255)	Hesperidina 1 grama ou placebo por 12 semanas associados a recomendação de dieta e atividade física em ambos os grupos	Alteração no esteatose hepática	Alteração no perfil lipídico e glicêmico, parâmetros antropométricos, proteína C reativa, fator de necrose tumoral alfa, fator nuclear kappa beta	Redução no grupo intervenção da alanina aminotransferase, gama glutamiltransferase, colesterol total, triglicerídeo, esteatose hepática, proteína C reativa, fator de necrose tumoral alfa, fator nuclear kappa beta
Castellino <i>et al.</i> , 2019 (256)	Suplementação de Altilix (<i>Bionap, Belpasso, Catania, Italy</i>) por 6 meses	Efeito no padrão de enzimas hepáticas, grau de DHGNA	Efeito no risco cardiovascular em pacientes com síndrome metabólica	Melhora do peso, circunferência abdominal, hemoglobina glicosilada, perfil lipídico, grau DHGNA, enzimas hepáticas, fluxo da artéria braquial, espessura íntima média carotídea

Stanley <i>et al.</i> , 2019 (257)	Efeito de tesamorelin em portadores do vírus da imunodeficiência humana e DHGNA	Efeito na gordura e histologia hepáticas	Mudança na glicose e hemoglobina glicosilada	Diminuição da fração hepática de gordura no grupo intervenção
Banitalebi <i>et al.</i> , 2019 (258)	Diferentes modalidades de atividade física (aeróbico, resistência ou placebo)	Efeitos nos índices de DHGNA (<i>fatty liver index, lipid accumulation product, hepatic steatosis index, e Framingham Steatosis Index</i>) em mulheres com DM-2	Glicose e hemoglobina glicosilada	Exercício, independente da modalidade melhoram os índices hepáticos da DHGNA e o perfil glicêmico em mulheres com DM-2
Ghetti <i>et al.</i> , 2019 (259)	Comparação do impacto de 3 meses de dieta e orientação nutricional vs apenas orientação nutricional em pacientes portadores de EHNA	Não avaliado	Avaliação na microbiota intestinal e perfil metabólico-nutricional	Houve redução no grupo dieta, em relação à linha de base, no peso e índice de massa corporal, circunferência da cintura, porcentagem de gordura, aspartato e alanina aminotransferases, gama glutamiltransferase, glicemia, HOMA-IR, colesterol total e triglicerídeos. Grupo dieta aumentou a densidade de microrganismos totais,

				enquanto no grupo controle houve redução de <i>Bacteroidetes</i> e <i>Verrucomicrobiales</i>
Singh <i>et al.</i> , 2019 (260)	Prática de Yoga ou não em mulheres pré-diabéticas	Caracterizar anormalidades hepáticas, tamanho hepático, infiltração gordurosa	Glicose, hemoglobina glicosilada e colesterol total	Os níveis de glicose e hemoglobina glicosilados foram significativamente reduzidos após Yoga, embora os níveis de colesterol tenham aumentado em mulheres na menopausa. Não houve melhora na gordura hepática

Ensaio clínico randomizado na DHGNA, a partir de junho 2019, tendo como objetivos os desfechos cardiovasculares e hepáticos. Busca pelos seguintes termos no *Pubmed*: *nonalcoholic fatty liver disease AND randomized controlled trial AND 1year*. *Sete estudos avaliaram o risco cardiovascular de uma forma mais estruturada. Abreviaturas. DHGNA: doença hepática gordurosa não alcoólica; DM: diabetes; IMC: índice de massa corporal; NAS: do inglês, *NAFLD activity score*.

Anexo 2: Ensaios clínicos randomizados na doença hepática gordurosa não alcoólica com objetivo cardiovascular, no último ano

Autor, ano	Intervenção	Objetivo cardiovascular	Resultado
Abdelbasset <i>et al.</i> , 2020 (233)	Exercício intervalado de alta intensidade vs intensidade contínua moderada por 8 semanas em pacientes obesos diabéticos portadores de DHGNA	Avaliação da adiposidade visceral	Ambos os grupos de exercício mostraram uma redução significativa nos lipídeos viscerais, enquanto o grupo controle não apresentou diferença estatisticamente significativa
Cai <i>et al.</i> , 2019 (253)	Jejum em dias alternados vs grupo controle entre 4 a 12 semanas de estudo	Avaliar a intervenção no peso corporal e perfil lipídico em pacientes portadores de DHGNA	Redução do peso e colesterol total no grupo intervenção
Darand <i>et al.</i> , 2019 (252)	Modificação do estilo de vida mais placebo ou 2 gramas/ dia de semente preta por 4 semanas	Efeito da semente preta (<i>Nigella sativa</i>) em fatores de risco cardiovascular em pacientes com DHGNA	Redução na glicose, insulina, resistência insulínica e aumento no índice de verificação quantitativa de sensibilidade à insulina
Castellino <i>et al.</i> , 2019 *(280)	Suplementação de Altilix (<i>Bionap, Belpasso, Catania, Italy</i>) por 6 meses	Efeito no risco cardiovascular em pacientes com síndrome metabólica	Melhora do peso, circunferência abdominal, hemoglobina glicosilada, perfil lipídico, fluxo da

			artéria braquial, espessura íntima média carotídea
Draz <i>et al.</i> , 2020 (234)	Eletroacupuntura vs treinamento intervalado aeróbico por 6 semanas em pessoas portadoras de DHGNA	Avaliação peso, índice de massa corporal, triglicerídeos, proteína C reativa	Ambas as intervenções apresentaram melhoras nos triglicerídeos, proteína C reativa, com quedas maiores no grupo da eletroacupuntura. Quanto a diferença entre os dois grupos o único marcador sem diferença estatisticamente significativa foi a proteína C reativa

Ensaio clínico randomizado na DHGNA no último ano a partir de junho 2019, tendo como objetivos desfechos cardiovasculares. Busca no *Pubmed* pelos seguintes termos: *nonalcoholic fatty liver disease AND cardiovascular AND randomized controlled trial AND 1year*. *Esse estudo teve a melhor forma de avaliação do risco cardiovascular. Abreviatura: DHGNA: doença hepática gordurosa não alcoólica.

11.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-57.
2. Eslam M, Sanyal AJ, George J, Panel IC. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1999-2014.
3. Sakamoto M, Tsujikawa H, Effendi K, Ojima H, Harada K, Zen Y, et al. Pathological findings of nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic fatty liver disease. *Pathol Int*. 2017;67(1):1-7.
4. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA*. 2020;323(12):1175-83.
5. Piscaglia F, Svegliati-Baroni G, Barchetti A, Pecorelli A, Marinelli S, Tiribelli C, et al. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology*. 2016;63(3):827-38.
6. Tanaka N, Kimura T, Fujimori N, Nagaya T, Komatsu M, Tanaka E. Current status, problems, and perspectives of non-alcoholic fatty liver disease research. *World J Gastroenterol*. 2019;25(2):163-77.
7. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018;24(7):908-22.

8. Tomic D, Kemp WW, Roberts SK. Nonalcoholic fatty liver disease: current concepts, epidemiology and management strategies. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2018;30(10):1103-15.
9. Patil R, Sood GK. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2017;8(2):51-8.
10. Gonzalez-Paredes FJ, Hernández Mesa G, Morales Arraez D, Marcelino Reyes R, Abrante B, Diaz-Flores F, et al. Contribution of Cyclooxygenase End Products and Oxidative Stress to Intrahepatic Endothelial Dysfunction in Early Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One*. 2016;11(5):1-15
11. Sookoian S, Castaño GO, Burgueño AL, Rosselli MS, Gianotti TF, Mallardi P, et al. Circulating levels and hepatic expression of molecular mediators of atherosclerosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*. 2010;209(2):585-91.
12. Treeprasertsuk S, Leverage S, Adams LA, Lindor KD, St Sauver J, Angulo P. The Framingham risk score and heart disease in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2012;32(6):945-50.
13. Goff DC, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(25):49-73.
14. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice:

The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts): Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). Eur J Prev Cardiol. 2016;23(11):1-96

15. Gjorgjieva M, Sobolewski C, Dolicka D, Correia de Sousa M, Foti M. miRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy. Gut. 2019;68(11):2065-79.

16. Aranda JF, Madrigal-Matute J, Rotllan N, Fernández-Hernando C. MicroRNA modulation of lipid metabolism and oxidative stress in cardiometabolic diseases. Free Radic Biol Med. 2013;64:31-9.

17. Ratziu V. Non-pharmacological interventions in non-alcoholic fatty liver disease patients. Liver Int. 2017;37(1):90-6.

18. Whitsett M, VanWagner LB. Physical activity as a treatment of non- alcoholic fatty liver disease: A systematic review. World J Hepatol. 2015;7(16):2041- 52.

19. Lonardo A, Ballestri S, Targher G, Loria P. Diagnosis and management of cardiovascular risk in nonalcoholic fatty liver disease. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2015;9(5):629-50.

20. Abenavoli L, Scarpellini E, Rouabhia S, Balsano C, Luzzza F. Probiotics in non-alcoholic fatty liver disease: which and when. Ann Hepatol. 2013;12(3):357-63.
21.

21. Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. J Hepatol. 2018;68(2):280-95.

22. Wijarnpreecha K, Lou S, Watthanasuntorn K, Kroner PT, Cheungpasitporn W, Lukens FJ, et al. Small intestinal bacterial overgrowth and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2019;32(5):601-8.

23. Tang Y, Huang J, Zhang WY, Qin S, Yang YX, Ren H, et al. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Therap Adv Gastroenterol*. 2019;12:1-23

24. Tang WH, Hazen SL. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4204-11.

25. Sepideh A, Karim P, Hossein A, Leila R, Hamdollah M, Mohammad E G, et al. Effects of Multistrain Probiotic Supplementation on Glycemic and Inflammatory Indices in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. *J Am Coll Nutr*. 2016;35(6):500-5.

26. Ma YY, Li L, Yu CH, Shen Z, Chen LH, Li YM. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2013;19(40):6911-8.

27. Sun J, Buys N. Effects of probiotics consumption on lowering lipids and CVD risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Med*. 2015;47(6):430-40.

28. Barbuti R, Schiavon L, Oliveira C, Alvares-da-Silva M, Sassaki L, Passos M, et al. Gut microbiota, prebiotics, probiotics, and synbiotics in gastrointestinal and liver diseases: proceedings of a joint meeting of the Brazilian Society of Hepatology (SBH), Brazilian Nucleus for the Study of *Helicobacter pylori* and Microbiota (NBEHPM), and Brazilian Federation of Gastroenterology (FBG). *Arq. Gastroenterol*. [Internet]. In press 2020. Epub Nov 16, 2020.

29. Oliveira CP, Cotrim HP, Stefano JT, Siqueira ACG, Salgado ALA, Parise ER. N-acetylcysteine and/or ursodeoxycholic acid associated with metformin in non-alcoholic steatohepatitis: an open-label multicenter randomized controlled trial. *Arq Gastroenterol*. 2019;56(2):184-90.

30. Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2019;394(10215):2184-96.

31. Traussnigg S, Schattenberg JM, Demir M, Wiegand J, Geier A, Teuber G, et al. Norursodeoxycholic acid versus placebo in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 dose-finding trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019;4(10):781-93.

32. (European Association for the Study of the Liver (EASL); European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of

Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64(6):1388-402.

33. Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol.* 2018;13:321-50.

34. Eckel N, Li Y, Kuxhaus O, Stefan N, Hu FB, Schulze MB. Transition from metabolic healthy to unhealthy phenotypes and association with cardiovascular disease risk across BMI categories in 90 257 women (the Nurses' Health Study): 30 year follow-up from a prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(9):714-24.

35. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero- Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol.* 2020.

36. Ferramosca A, Zara V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol.* 2014;20(7):1746-55.

37. Ibrahim SH, Hirsova P, Gores GJ. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis: sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation. *Gut.* 2018;67(5):963-72.

38. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016;65(8):1038-48.

39. Bugianesi E, Moscatiello S, Ciaravella MF, Marchesini G. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des.* 2010;16(17):1941-51.

40. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23(47):8263-76.
41. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
42. Goulart AC, Oliveira IR, Alencar AP, Santos MS, Santos IS, Martines BM, et al. Diagnostic accuracy of a noninvasive hepatic ultrasound score for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Sao Paulo Med J*. 2015;133(2):115-24.
43. Marchesini G, Mazzotti A. NAFLD incidence and remission: only a matter of weight gain and weight loss? *J Hepatol*. 2015;62(1):15-7.
44. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12(6):295-300.
45. Kotronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietiläinen KH, Yki-Järvinen H. Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(9):3490-7.
46. Angelico F, Del Ben M, Conti R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(3):1578-82.
47. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1111-9.

48. Ryan MC, Wilson AM, Slavin J, Best JD, Jenkins AJ, Desmond PV. Associations between liver histology and severity of the metabolic syndrome in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care*. 2005;28(5):1222-4.
49. Kim D, Chung GE, Kwak MS, Seo HB, Kang JH, Kim W, et al. Body Fat Distribution and Risk of Incident and Regressed Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;14(1):132-43.
50. Chang Y, Ryu S, Sung E, Woo HY, Cho SI, Yoo SH, et al. Weight gain within the normal weight range predicts ultrasonographically detected fatty liver in healthy Korean men. *Gut*. 2009;58(10):1419-25.
51. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51(6):1961-71.
52. Ballestri S, Zona S, Targher G, Romagnoli D, Baldelli E, Nascimbeni F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(5):936-44.
53. Stepanova M, Rafiq N, Younossi ZM. Components of metabolic syndrome are independent predictors of mortality in patients with chronic liver disease: a population-based study. *Gut*. 2010;59(10):1410-5.
54. Loomba R, Abraham M, Unalp A, Wilson L, Lavine J, Doo E, et al. Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology*. 2012;56(3):943-51.

55. Doycheva I, Cui J, Nguyen P, Costa EA, Hooker J, Hofflich H, et al. Non-invasive screening of diabetics in primary care for NAFLD and advanced fibrosis by MRI and MRE. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43(1):83-95.

56. Kwok R, Choi KC, Wong GL, Zhang Y, Chan HL, Luk AO, et al. Screening diabetic patients for non-alcoholic fatty liver disease with controlled attenuation parameter and liver stiffness measurements: a prospective cohort study. *Gut.* 2016;65(8):1359-68.

57. Bazick J, Donithan M, Neuschwander-Tetri BA, Kleiner D, Brunt EM, Wilson L, et al. Clinical Model for NASH and Advanced Fibrosis in Adult Patients With Diabetes and NAFLD: Guidelines for Referral in NAFLD. *Diabetes Care.* 2015;38(7):1347-55.

58. López-Suárez A, Guerrero JM, Elvira-González J, Beltrán-Robles M, Cañas-Hormigo F, Bascuñana-Quirell A. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with blood pressure in hypertensive and nonhypertensive individuals from the general population with normal levels of alanine aminotransferase. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23(11):1011-7.

59. Aneni EC, Oni ET, Martin SS, Blaha MJ, Agatston AS, Feldman T, et al. Blood pressure is associated with the presence and severity of nonalcoholic fatty liver disease across the spectrum of cardiometabolic risk. *J Hypertens.* 2015;33(6):1207-14.

60. Ma J, Hwang SJ, Pedley A, Massaro JM, Hoffmann U, Chung RT, et al. Bi-directional analysis between fatty liver and cardiovascular disease risk factors. *J Hepatol.* 2017;66(2):390-7.

61. Ryoo JH, Suh YJ, Shin HC, Cho YK, Choi JM, Park SK. Clinical association between non-alcoholic fatty liver disease and the development of hypertension. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(11):1926-31.
62. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(4):643-54.
63. Dongiovanni P, Anstee QM, Valenti L. Genetic predisposition in NAFLD and NASH: impact on severity of liver disease and response to treatment. *Curr Pharm Des*. 2013;19(29):5219-38.
64. Schwimmer JB, Celedon MA, Lavine JE, Salem R, Campbell N, Schork NJ, et al. Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2009;136(5):1585-92.
65. Loomba R, Schork N, Chen CH, Bettencourt R, Bhatt A, Ang B, et al. Heritability of Hepatic Fibrosis and Steatosis Based on a Prospective Twin Study. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1784-93.
66. Loomba R, Rao F, Zhang L, Khandrika S, Ziegler MG, Brenner DA, et al. Genetic covariance between gamma-glutamyl transpeptidase and fatty liver risk factors: role of beta2-adrenergic receptor genetic variation in twins. *Gastroenterology*. 2010;139(3):836-45.
67. Guerrero R, Vega GL, Grundy SM, Browning JD. Ethnic differences in hepatic steatosis: an insulin resistance paradox? *Hepatology*. 2009;49(3):791-801.

68. Rich NE, Oji S, Mufti AR, Browning JD, Parikh ND, Odewole M, et al. Racial and Ethnic Disparities in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Prevalence, Severity, and Outcomes in the United States: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018;16(2):198-210.

69. Chen LZ, Xin YN, Geng N, Jiang M, Zhang DD, Xuan SY. PNPLA3 I148M variant in nonalcoholic fatty liver disease: demographic and ethnic characteristics and the role of the variant in nonalcoholic fatty liver fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2015;21(3):794-802.

70. Pingitore P, Dongiovanni P, Motta BM, Meroni M, Lepore SM, Mancina RM, et al. PNPLA3 overexpression results in reduction of proteins predisposing to fibrosis. *Hum Mol Genet*. 2016;25(23):5212-22.

71. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2011;53(6):1883-94.

72. Yang JD, Abdelmalek MF, Pang H, Guy CD, Smith AD, Diehl AM, et al. Gender and menopause impact severity of fibrosis among patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2014;59(4):1406-14.

73. Lazo M, Hernaez R, Eberhardt MS, Bonekamp S, Kamel I, Guallar E, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Epidemiol*. 2013;178(1):38-45.

74. Sumida Y, Nakajima A, Itoh Y. Limitations of liver biopsy and non- invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(2):475-85.

75. Vuppalanchi R, Unalp A, Van Natta ML, Cummings OW, Sandrasegaran KE, Hameed T, et al. Effects of liver biopsy sample length and number of readings on sampling variability in nonalcoholic Fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(4):481-6.

76. Cadranel JF, Rufat P, Degos F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEFL). *Hepatology*. 2000;32(3):477-81.

77. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56(5):1751-9.

78. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, Kamel I, Brancati FL, Guallar E, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology*. 2011;54(3):1082-90.

79. Roldan-Valadez E, Favila R, Martínez-López M, Uribe M, Méndez- Sánchez N. Imaging techniques for assessing hepatic fat content in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2008;7(3):212-20.

80. Leoni S, Tovoli F, Napoli L, Serio I, Ferri S, Bolondi L. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol*. 2018;24(30):3361-73.

81. de Lédinghen V, Vergniol J, Capdepon M, Chermak F, Hiriart JB, Cassinotto C, et al. Controlled attenuation parameter (CAP) for the diagnosis of steatosis: a prospective study of 5323 examinations. *J Hepatol.* 2014;60(5):1026-31.
82. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan AW, Chermak F, et al. Liver stiffness measurement using XL probe in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(12):1862-71.
83. Kim D, Kim WR, Kim HJ, Therneau TM. Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology.* 2013;57(4):1357-65.
84. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7(10):1104-12.
85. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med.* 2011;43(8):617-49.
86. Brunt EM, Wong VW, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1(15080):1-22.
87. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab.* 2015;21(5):739-46.

88. Sutti S, Jindal A, Locatelli I, Vacchiano M, Gigliotti L, Bozzola C, et al. Adaptive immune responses triggered by oxidative stress contribute to hepatic inflammation in NASH. *Hepatology*. 2014;59(3):886-97.
89. Mehal WZ. The inflammasome in liver injury and non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*. 2014;32(5):507-15.
90. Caldwell S, Argo C. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*. 2010;28(1):162-8.
91. Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol*. 2018;68(2):268-79.
92. Haflidadottir S, Jonasson JG, Norland H, Einarsdottir SO, Kleiner DE, Lund SH, et al. Long-term follow-up and liver-related death rate in patients with non-alcoholic and alcoholic related fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:166.
93. Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J Hepatol*. 2018;68(2):335-52.
94. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nagata C, Takeda J, Sarui H, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(10):1579-84.
95. Oni ET, Agatston AS, Blaha MJ, Fialkow J, Cury R, Sposito A, et al. A systematic review: burden and severity of subclinical cardiovascular disease among those with nonalcoholic fatty liver; should we care? *Atherosclerosis*. 2013;230(2):258-67.

96. Fracanzani AL, Burdick L, Raselli S, Pedotti P, Grigore L, Santorelli G, et al. Carotid artery intima-media thickness in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Med.* 2008;121(1):72-8.
97. Sookoian S, Pirola CJ. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hepatol.* 2008;49(4):600-7.
98. Motamed N, Rabiee B, Poustchi H, Dehestani B, Hemasi GR, Khonsari MR, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and 10-year risk of cardiovascular diseases. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2017;41(1):31-8.
99. Petta S, Argano C, Colomba D, Cammà C, Di Marco V, Cabibi D, et al. Epicardial fat, cardiac geometry and cardiac function in patients with non-alcoholic fatty liver disease: association with the severity of liver disease. *J Hepatol.* 2015;62(4):928-33.
100. Musso G, Gambino R, Tabibian JH, Ekstedt M, Kechagias S, Hamaguchi M, et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2014;11(7):1-26.
101. Ballestri S, Lonardo A, Bonapace S, Byrne CD, Loria P, Targher G. Risk of cardiovascular, cardiac and arrhythmic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(7):1724-45.
102. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol.* 2016;65(3):589-600.

103. 107. VanWagner LB, Wilcox JE, Colangelo LA, Lloyd-Jones DM, Carr JJ, Lima JA, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with subclinical myocardial remodeling and dysfunction: A population-based study. *Hepatology*. 2015;62(3):773- 83.

104. Hallsworth K, Hollingsworth KG, Thoma C, Jakovljevic D, MacGowan GA, Anstee QM, et al. Cardiac structure and function are altered in adults with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2013;58(4):757-62.

105. Käräjämäki AJ, Päätsi OP, Savolainen M, Kesäniemi YA, Huikuri H, Ukkola O. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease as a Predictor of Atrial Fibrillation in Middle-Aged Population (OPERA Study). *PLoS One*. 2015;10(11):1-13.

106. Hung CS, Tseng PH, Tu CH, Chen CC, Liao WC, Lee YC, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated With QT Prolongation in the General Population. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(7):1-17.

107. Mantovani A, Pernigo M, Bergamini C, Bonapace S, Lipari P, Valbusa F, et al. Heart valve calcification in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2015;64(8):879-87.

108. Mantovani A, Rigamonti A, Bonapace S, Bolzan B, Pernigo M, Morani G, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated With Ventricular Arrhythmias in Patients With Type 2 Diabetes Referred for Clinically Indicated 24-Hour Holter Monitoring. *Diabetes Care*. 2016;39(8):1416-23.

109. Puchner SB, Lu MT, Mayrhofer T, Liu T, Pursnani A, Ghoshhajra BB, et al. High-risk coronary plaque at coronary CT angiography is associated with

nonalcoholic fatty liver disease, independent of coronary plaque and stenosis burden: results from the ROMICAT II trial. *Radiology*. 2015;274(3):693-701.

110. Lonardo A, Sookoian S, Pirola CJ, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of cardiovascular disease. *Metabolism*. 2016;65(8):1136-50.

111. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. 2013;31(7):1281-357.

112. Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. Gamma-glutamyltransferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: analysis of the British Women's Heart and Health Study and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(12):2729-35.

113. Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CD, Heine RJ, et al. Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis*. 2007;191(2):391-6.

114. Yeh ET, Willerson JT. Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation*. 2003;107(3):370-1.

115. Lautamäki R, Borra R, Iozzo P, Komu M, Lehtimäki T, Salmi M, et al. Liver steatosis coexists with myocardial insulin resistance and coronary dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(2):282-90.

116. Pisetta C, Chillè C, Pelizzari G, Pigozzi MG, Salvetti M, Painsi A, et al. Evaluation of Cardiovascular Risk in Patient with Primary Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2020;27(4):321-30.
117. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation.* 1996;93(4):672-82.
118. Linhares LMC, Oliveira CP, Alvares-da-Silva MR, Stefano JT, Barbeiro HV, Barbeiro DF, et al. Evolution of Biomarkers of Atherogenic Risk in Liver Transplantation Recipients. *Transplant Proc.* 2018;50(10):3650-5.
119. Lefere S, Van de Velde F, Devisscher L, Bekaert M, Raevens S, Verhelst X, et al. Serum vascular cell adhesion molecule-1 predicts significant liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Obes (Lond).* 2017;41(8):1207-13.
120. Targher G, Chonchol M, Miele L, Zoppini G, Pichiri I, Muggeo M. Nonalcoholic fatty liver disease as a contributor to hypercoagulation and thrombophilia in the metabolic syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2009;35(3):277-87.
121. Jung RG, Motazedian P, Ramirez FD, Simard T, Di Santo P, Visintini S, et al. Association between plasminogen activator inhibitor-1 and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Thromb J.* 2018;16:1-12.
122. Xanthakis V, Enserro DM, Murabito JM, Polak JF, Wollert KC, Januzzi JL, et al. Ideal cardiovascular health: associations with biomarkers and subclinical disease

and impact on incidence of cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study. *Circulation*. 2014;130(19):1676-83.

123. Chang ML, Hsu CM, Tseng JH, Tsou YK, Chen SC, Shiau SS, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease whereas leptin and adiponectin vary between genders. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30(2):329-36.

124. Tofler GH, Massaro J, O'Donnell CJ, Wilson PWF, Vasan RS, Sutherland PA, et al. Plasminogen activator inhibitor and the risk of cardiovascular disease: The Framingham Heart Study. *Thromb Res*. 2016;140:30-5.

125. Ajmera V, Perito ER, Bass NM, Terrault NA, Yates KP, Gill R, et al. Novel plasma biomarkers associated with liver disease severity in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2017;65(1):65-77.

126. Adams LA, Anstee QM, Tilg H, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases. *Gut*. 2017;66(6):1138-53.

127. Tariq R, Axley P, Singal AK. Extra-Hepatic Manifestations of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Review. *J Clin Exp Hepatol*. 2020;10(1):81-7.

128. Major RW, Cheng MRI, Grant RA, Shantikumar S, Xu G, Oozeerally I, et al. Cardiovascular disease risk factors in chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13(3):1-18.

129. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(3):203-22.
130. Li Y, Chen Z. The oncogenic role of microRNA-500a in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2020;19(3):1799-805.
131. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009;11(3):228-34.
132. Samir M, Vaas LA, Pessler F. MicroRNAs in the Host Response to Viral Infections of Veterinary Importance. *Front Vet Sci.* 2016;3(86):1-17.
133. Baffy G. MicroRNAs in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Med.* 2015;4(12):1977-88.
134. Pirola CJ, Fernández Gianotti T, Castaño GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut.* 2015;64(5):800-12.
135. Albinsson S, Suarez Y, Skoura A, Offermanns S, Miano JM, Sessa WC. MicroRNAs are necessary for vascular smooth muscle growth, differentiation, and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(6):1118-26.
136. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12(12):861-74.

137. Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS, et al. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *Am J Hum Genet.* 2007;81(2):405-13.
138. Mellis D, Caporali A. MicroRNA-based therapeutics in cardiovascular disease: screening and delivery to the target. *Biochem Soc Trans.* 2018;46(1):11-21.
139. Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature.* 2012;492(7429):376-81.
140. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J.* 2010;31(6):659-66.
141. Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):239-50.
142. Chai C, Rivkin M, Berkovits L, Simerzin A, Zorde-Khvalevsky E, Rosenberg N, et al. Metabolic Circuit Involving Free Fatty Acids, microRNA 122, and Triglyceride Synthesis in Liver and Muscle Tissues. *Gastroenterology.* 2017;153(5):1404-15.
143. Liu CH, Ampuero J, Gil-Gómez A, Montero-Vallejo R, Rojas Á, Muñoz-Hernández R, et al. miRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2018;69(6):1335-48.

144. Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin Chim Acta*. 2013;424:99-103.
145. Miyaaki H, Ichikawa T, Kamo Y, Taura N, Honda T, Shibata H, et al. Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2014;34(7):302-7.
146. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science*. 2010;328(5985):1566-9.
147. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*. 2010;328(5985):1570-3.
148. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2921-31.
149. Mehta R, Otgonsuren M, Younoszai Z, Allawi H, Raybuck B, Younossi Z. Circulating miRNA in patients with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. *BMJ Open Gastroenterol*. 2016;3(1):1-7.
150. Zhao W, Zhao SP, Zhao YH. MicroRNA-143/-145 in Cardiovascular Diseases. *Biomed Res Int*. 2015;2015(531740):1-9.

151. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 2010;107(5):677-84.
152. Meder B, Keller A, Vogel B, Haas J, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, et al. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(1):13-23.
153. Kontaraki JE, Marketou ME, Zacharis EA, Parthenakis FI, Vardas PE. Differential expression of vascular smooth muscle-modulating microRNAs in human peripheral blood mononuclear cells: novel targets in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2014;28(8):510-6.
154. D'Alessandra Y, Carena MC, Spazzafumo L, Martinelli F, Bassetti B, Devanna P, et al. Diagnostic potential of plasmatic MicroRNA signatures in stable and unstable angina. *PLoS One*. 2013;8(11):1-11.
155. DeFilippis AP, Young R, Carrubba CJ, McEvoy JW, Budoff MJ, Blumenthal RS, et al. An analysis of calibration and discrimination among multiple cardiovascular risk scores in a modern multiethnic cohort. *Ann Intern Med*. 2015;162(4):266-75.
156. Kavousi M, Leening MJ, Nanchen D, Greenland P, Graham IM, Steyerberg EW, et al. Comparison of application of the ACC/AHA guidelines, Adult Treatment Panel III guidelines, and European Society of Cardiology guidelines for cardiovascular disease prevention in a European cohort. *JAMA*. 2014;311(14):1416- 23.

157. Golabi P, Fukui N, Paik J, Sayiner M, Mishra A, Younossi ZM. Mortality Risk Detected by Atherosclerotic Cardiovascular Disease Score in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatol Commun*. 2019;3(8):1050-60.
158. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 2003;24(11):987-1003.
159. Précoma DB, Oliveira GMM, Simão AF, Dutra OP, Coelho OR, Izar MCO, et al. Updated Cardiovascular Prevention Guideline of the Brazilian Society of Cardiology - 2019. *Arq Bras Cardiol*. 2019;113(4):787-891.
160. Fernández-Macías JC, Ochoa-Martínez AC, Varela-Silva JA, Pérez-Maldonado IN. Atherogenic Index of Plasma: Novel Predictive Biomarker for Cardiovascular Illnesses. *Arch Med Res*. 2019;50(5):285-94.
161. Olamoyegun MA, Oluyombo R, Asaolu SO. Evaluation of dyslipidemia, lipid ratios, and atherogenic index as cardiovascular risk factors among semi-urban dwellers in Nigeria. *Ann Afr Med*. 2016;15(4):194-9.
162. Sujatha R, Kavitha S. Atherogenic indices in stroke patients: A retrospective study. *Iran J Neurol*. 2017;16(2):78-82.
163. Bhardwaj S, Bhattacharjee J, Bhatnagar MK, Tyagi S. Atherogenic index of plasma, castelli risk index and atherogenic coefficient- new parameters in assessing cardiovascular risk. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 2013;3(3):359-64.
164. Roeb E, Geier A. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) - current treatment recommendations and future developments. *Z Gastroenterol*. 2019;57(4):508-17.

165. Townsend SA, Newsome PN. Review article: new treatments in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;46(5):494-507.

166. Lin JS, O'Connor EA, Evans CV, Senger CA, Rowland MG, Groom HC. Behavioral Counseling to Promote a Healthy Lifestyle for Cardiovascular Disease Prevention in Persons With Cardiovascular Risk Factors: An Updated Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. [livro online]. Rockville (US): Agency for Healthcare Research and Quality; 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK241537/>

167. Barrès R, Zierath JR. The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(8):441-51.

168. Guthold R, Stevens GA, Riley LM, Bull FC. Worldwide trends in insufficient physical activity from 2001 to 2016: a pooled analysis of 358 population-based surveys with 1·9 million participants. *Lancet Glob Health.* 2018;6(10):1077-86.

169. Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, Ward G, Trost N, Hofferberth S, et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2013;59(1):138-43.

170. Wong VW, Chan WK, Chitturi S, Chawla Y, Dan YY, Duseja A, et al. Asia-Pacific Working Party on Non-alcoholic Fatty Liver Disease guidelines 2017-Part 1: Definition, risk factors and assessment. *J Gastroenterol Hepatol.* 2018;33(1):70-85.

171. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2010;362(18):1675-85.

172. Asleh R, Briasoulis A, Berinstein EM, Wiener JB, Palla M, Kushwaha SS, et al. Meta-analysis of the association of the haptoglobin genotype with cardiovascular outcomes and the pharmacogenomic interactions with vitamin E supplementation. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2018;11:71-82.

173. Dongiovanni P, Petta S, Mannisto V, Mancina RM, Pipitone R, Karja V, et al. Statin use and non-alcoholic steatohepatitis in at risk individuals. *J Hepatol*. 2015;63(3):705-12.

174. Konerman MA, Jones JC, Harrison SA. Pharmacotherapy for NASH: Current and emerging. *J Hepatol*. 2018;68(2):362-75.

175. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet*. 2016;387(10019):679-90.

176. Newsome PN, Buchholtz K, Cusi K, Linder M, Okanoue T, Ratziu V, et al. A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2020;13: 1-12.

177. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2015;385(9972):956-65.

178. Ratziu V, Sanyal AJ, Loomba R, Rinella M, Harrison S, Anstee QM, et al. REGENERATE: Design of a pivotal, randomised, phase 3 study evaluating the safety

and efficacy of obeticholic acid in patients with fibrosis due to nonalcoholic steatohepatitis. *Contemp Clin Trials*. 2019;84(105803):1-7.

179. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Leher P, Serfaty L, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology*. 2016;150(5):1147-59.

180. Gawrieh S, Chalasani N. Emerging Treatments for Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2018;22(1):189-99.

181. Pedrosa M, Seyedkazemi S, Francque S, Sanyal A, Rinella M, Charlton M, et al. A randomized, double-blind, multicenter, phase 2b study to evaluate the safety and efficacy of a combination of tropifexor and cenicriviroc in patients with nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis: Study design of the TANDEM trial. *Contemp Clin Trials*. 2020;88(105889):1-10.

182. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(4):227-38.

183. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016;164(3):337-40.

184. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016;14(8):1-14.

185. Consortium HMP. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.

186. Duarte SMB, Stefano JT, Oliveira CP. Microbiota and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH). *Ann Hepatol.* 2019;18(3):416-21.
187. Arab JP, Arrese M, Shah VH. Gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease and alcohol-related liver disease: Current concepts and perspectives. *Hepatol Res.* 2019;50(4):407-18.
188. Tripathi A, Debelius J, Brenner DA, Karin M, Loomba R, Schnabl B, et al. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(7):397-411.
189. Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(1):9-21.
190. Rodrigues FAP, Medeiros PHQS, Prata MMG, Lima AAM. Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica. 1ed. São Paulo: Blucher; 2016. p441-78
191. Hu H, Lin A, Kong M, Yao X, Yin M, Xia H, et al. Intestinal microbiome and NAFLD: molecular insights and therapeutic perspectives. *J Gastroenterol.* 2020;55(2):142-58.
192. Mouries J, Brescia P, Silvestri A, Spadoni I, Sorribas M, Wiest R, et al. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *J Hepatol.* 2019;71(6):1216-28.

193. Leylabadlo HE, Ghotaslou R, Kafil HS, Feizabadi MM, Moaddab SY, Farajnia S, et al. Non-alcoholic fatty liver diseases: from role of gut microbiota to microbial-based therapies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;39(4):613-27.
194. Pendyala S, Walker JM, Holt PR. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology*. 2012;142(5):1100-1.
195. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology*. 2016;63(3):764-75.
196. Ghoshal UC, Ghoshal U. Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Other Intestinal Disorders. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017;46(1):103-20.
197. Paoletta G, Mandato C, Pierri L, Poeta M, Di Stasi M, Vajro P. Gut-liver axis and probiotics: their role in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(42):15518-31.
198. Hulston CJ, Churnside AA, Venables MC. Probiotic supplementation prevents high-fat, overfeeding-induced insulin resistance in human subjects. *Br J Nutr*. 2015;113(4):596-602.
199. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506-14.

200. Tuohy KM, Fava F, Viola R. 'The way to a man's heart is through his gut microbiota' – dietary pro- and prebiotics for the management of cardiovascular risk. *Proceedings of the Nutrition Society*.2014;73:172–85.
201. Lavekar AS, Raje DV, Manohar T, Lavekar AA. Role of Probiotics in the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-analysis. *Euroasian J Hepatogastroenterol*. 2017;7(2):130-7.
202. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(7):412-25.
203. Resta-Lenert S, Barrett KE. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*. 2003;52(7):988-97.
204. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50959-65.
205. Duseja A, Acharya SK, Mehta M, Chhabra S, Rana S, Das A, et al. High potency multistrain probiotic improves liver histology in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a randomised, double-blind, proof of concept study. *BMJ Open Gastroenterol*. 2019;6(1):1-9.
206. Khan MY, Mihali AB, Rawala MS, Aslam A, Siddiqui WJ. The promising role of probiotic and synbiotic therapy in aminotransferase levels and inflammatory markers in patients with nonalcoholic fatty liver disease - a systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2019;31(6):703-15.

207. Aller R, De Luis DA, Izaola O, Conde R, Gonzales Sagrado M, Primo D, et al. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. Eur Rev Med Pharmacol Sci.2011;15(9):1090-5.

208. Barengolts E. GUT MICROBIOTA, PREBIOTICS, PROBIOTICS, AND SYNBIOTICS IN MANAGEMENT OF OBESITY AND PREDIABETES: REVIEW OF RANDOMIZED CONTROLLED TRIALS. Endocr Pract. 2016;22(10):1224-34.

209. Manzhali E, Virchenko O, Falalyeyeva T, Beregova T, Stremmel W. Treatment efficacy of a probiotic preparation for non-alcoholic steatohepatitis: A pilot trial. J Dig Dis. 2017;18(12):698-703.

210. Ferolla SM, Couto CA, Costa-Silva L, Armiliato GN, Pereira CA, Martins FS, et al. Beneficial Effect of Synbiotic Supplementation on Hepatic Steatosis and Anthropometric Parameters, But Not on Gut Permeability in a Population with Nonalcoholic Steatohepatitis. Nutrients. 2016;8(7):397-417.

211. Wong VW, Won GL, Chim AM, Chu WC, Yeung DK, Li KC, et al. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. Ann Hepatol. 2013;12(2):256-62.

212. Vrieze A, Nood EV, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. Gastroenterology.2012;143(4): 913- 6.

213. Hassan A, Din AU, Zhu Y, Zhang K, Li T, Wang Y, et al. Updates in understanding the hypocholesterolemia effect of probiotics on atherosclerosis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(15):5993-6006.
214. Mo R, Zhang X, Yang Y. Effect of probiotics on lipid profiles in hypercholesterolaemic adults: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Med Clin (Barc)*.2019;152(12):473-81.
215. Gan XT, Ettinger G, Huang CX, Burton JP, Haist JV, Rajapurohitam V, et al. Probiotic administration attenuates myocardial hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat. *Circ Heart Fail*. 2014;7(3):491-9.
216. Costanza AC, Moscovitch SD, Faria Neto HC, Mesquita ET. Probiotic therapy with *Saccharomyces boulardii* for heart failure patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Int J Cardiol*. 2015;179:348-50.
217. Malik M, Suboc TM, Tyagi S, Salzman N, Wang J, Ying R, et al. *Lactobacillus plantarum* 299v Supplementation Improves Vascular Endothelial Function and Reduces Inflammatory Biomarkers in Men With Stable Coronary Artery Disease. *Circ Res*. 2018;123(9):1091-102.
218. Szulińska M, Łoniewski I, Skrypnik K, Sobieska M, Korybalska K, Suliburska J, et al. Multispecies Probiotic Supplementation Favorably Affects Vascular Function and Reduces Arterial Stiffness in Obese Postmenopausal Women-A 12-Week Placebo-Controlled and Randomized Clinical Study. *Nutrients*. 2018;10(11):1672-90.

219. Naruszewicz M, Johansson ML, Zapolska-Downar D, Bukowska H. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(6):1249-55.

220. Houghton D, Zalewski P, Hallsworth K, Cassidy S, Thoma C, Avery L, et al. The degree of hepatic steatosis associates with impaired cardiac and autonomic function. *J Hepatol*. 2019;70(6):1203-13.

221. Bock PM, Telo GH, Ramalho R, Sbaraini M, Leivas G, Martins AF, et al. The effect of probiotics, prebiotics or synbiotics on metabolic outcomes in individuals with diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*. [publicação online];2020[acesso em 9 de outubro de 2020]. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05295-1>.

222. Dixon A, Robertson K, Yung A, Que M, Randall H, Wellalagodage D, et al. Efficacy of Probiotics in Patients of Cardiovascular Disease Risk: a Systematic Review and Meta-analysis. *Curr Hypertens Rep*. 2020;22(9):74-101.

223. Zhang K, Chen X, Zhang L, Deng Z. Fermented dairy foods intake and risk of cardiovascular diseases: A meta-analysis of cohort studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(7):1189-94.

224. Scorletti E, Afolabi PR, Miles EA, Smith DE, Almeahmadi A, Alshathry A, et al. Design and rationale of the INSYTE study: A randomised, placebo controlled study to test the efficacy of a synbiotic on liver fat, disease biomarkers and intestinal microbiota in non-alcoholic fatty liver disease. *Contemp Clin Trials*. 2018;71:113-23.

225. Silva-Sperb AS, Moraes HA, de Moura BC, Alves BC, Bruch-Bertani JP, Azevedo VZ, et al. Effect of probiotic supplementation in nonalcoholic steatohepatitis patients: PROBILIVER TRIAL protocol. *Trials*. 2019;20(1):580-8.
226. Fan JG, Cao HX. Role of diet and nutritional management in non- alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(4):81-7.
227. Federico A, Dallio M, Godos J, Loguercio C, Salomone F. Targeting gut-liver axis for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: translational and clinical evidence. *Transl Res*. 2016;167(1):116-24.
228. Ferro D, Baratta F, Pastori D, Cocomello N, Colantoni A, Angelico F, et al. New Insights into the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Gut- Derived Lipopolysaccharides and Oxidative Stress. *Nutrients*. 2020;12(9):1-14.
229. Zvenigorodskaya LA, Samsonova NG, Mel'nikova NV, Cherkashova EA. Hypolipidemic therapy in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental & Clinical Gastroenterology*. 2010 (7):25-33.
230. Jones RB, Alderete TL, Martin AA, Geary BA, Hwang DH, Palmer SL, et al. Probiotic supplementation increases obesity with no detectable effects on liver fat or gut microbiota in obese Hispanic adolescents: a 16-week, randomized, placebo-controlled trial. *Pediatr Obes*. 2018;13(11):705-14.
231. Chahwan B, Kwan S, Isik A, van Hemert S, Burke C, Roberts L. Gut feelings: A randomised, triple-blind, placebo-controlled trial of probiotics for depressive symptoms. *J Affect Disord*. 2019;253:317-26.

232. De Andrés J, Manzano S, García C, Rodríguez JM, Espinosa-Martos I, Jiménez E. Modulatory effect of three probiotic strains on infants' gut microbial composition and immunological parameters on a placebo-controlled, double-blind, randomised study. *Benef Microbes*. 2018;9(4):573-84.

233. Abdelbasset WK, Tantawy SA, Kamel DM, Alqahtani BA, Elnegamy TE, Soliman GS, et al. Effects of high-intensity interval and moderate-intensity continuous aerobic exercise on diabetic obese patients with nonalcoholic fatty liver disease: A comparative randomized controlled trial. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(10):1-6.

234. Draz RS, Serry ZMH, Rahmy AF, El Bardesi MS, Taha MM. Electroacupuncture Versus Aerobic Interval Training on Liver Functions in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver. *J Altern Complement Med*. 2020;26(1):51-7.

235. Dong C, Zhang CR, Xue BY, Miu WF, Fang NY, Li K, et al. Electroacupuncture combined with lifestyle control on obese nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Zhongguo Zhen Jiu*. 2020;40(2):129-34.

236. Okour M, Brigandi RA, Tenero D. A population analysis of the DGAT1 inhibitor GSK3008356 and its effect on endogenous and meal-induced triglyceride turnover in healthy subjects. *Fundam Clin Pharmacol*. 2019;33(5):567-80.

237. Shimizu M, Suzuki K, Kato K, Jojima T, Iijima T, Murohisa T, et al. Evaluation of the effects of dapagliflozin, a sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor, on hepatic steatosis and fibrosis using transient elastography in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab*. 2019;21(2):285-92.

238. Saadati S, Sadeghi A, Mansour A, Yari Z, Poustchi H, Hedayati M, et al. Curcumin and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, placebo controlled clinical trial. *BMC Gastroenterol.* 2019;19(1):133-9.

239. Mirhafez SR, Farimani AR, Dehhabe M, Bidkhori M, Hariri M, Ghouchani BF, et al. Effect of Phytosomal Curcumin on Circulating Levels of Adiponectin and Leptin in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J Gastrointest Liver Dis.* 2019;28:183-9.

240. Ghaffari A, Rafrat M, Navekar R, Sepehri B, Asghari-Jafarabadi M, Ghavami SM. Turmeric and chicory seed have beneficial effects on obesity markers and lipid profile in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Int J Vitam Nutr Res.* 2019;89(5-6):293-302.

241. Maleki Z, Jazayeri S, Eslami O, Shidfar F, Hosseini AF, Agah S, et al. Effect of soy milk consumption on glycemic status, blood pressure, fibrinogen and malondialdehyde in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Complement Ther Med.* 2019;44:44-50.

242. Chen Y, Feng R, Yang X, Dai J, Huang M, Ji X, et al. Yogurt improves insulin resistance and liver fat in obese women with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2019;109(6):1611-9.

243. Marin-Alejandro BA, Abete I, Cantero I, Monreal JI, Elorz M, Herrero JI, et al. The Metabolic and Hepatic Impact of Two Personalized Dietary Strategies in Subjects with Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Fatty Liver in Obesity (FLiO) Randomized Controlled Trial. *Nutrients.* 2019;11(10):2543-59.

244. Harrison SA, Bashir MR, Guy CD, Zhou R, Moylan CA, Frias JP, et al. Resmetirom (MGL-3196) for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2019;394(10213):2012-24.

245. Sangsefidi ZS, Hosseinzadeh M, Ranjbar AM, Akhondi-Meybodi M, Fallahzadeh H, Mozaffari-Khosravi H. The effect of total anthocyanin-base standardized (*Cornus mas* L.) fruit extract on liver function, tumor necrosis factor α , malondealdehyde, and adiponectin in patients with non-alcoholic fatty liver: a study protocol for a double-blind randomized clinical trial. *Nutr J*. 2019;18(1):39-46.

246. Rahmanabadi A, Mahboob S, Amirkhizi F, Hosseinpour-Arjmand S, Ebrahimi-Mameghani M. Oral α -lipoic acid supplementation in patients with non-alcoholic fatty liver disease: effects on adipokines and liver histology features. *Food Funct*. 2019;10(8):4941-52.

247. Sanyal A, Charles ED, Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Harrison SA, Abdelmalek MF, et al. Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Lancet*. 2019;392(10165):2705-17.

248. Navarro VJ, Belle SH, D'Amato M, Adfhal N, Brunt EM, Fried MW, et al. Silymarin in non-cirrhotics with non-alcoholic steatohepatitis: A randomized, double-blind, placebo controlled trial. *PLoS One*. 2019;14(9):1-12.

249. Bomhof MR, Parnell JA, Ramay HR, Crotty P, Rioux KP, Probert CS, et al. Histological improvement of non-alcoholic steatohepatitis with a prebiotic: a pilot clinical trial. *Eur J Nutr*. 2019;58(4):1735-45.

250. Bril F, Biernacki DM, Kalavalapalli S, Lomonaco R, Subbarayan SK, Lai J, et al. Role of Vitamin E for Nonalcoholic Steatohepatitis in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial. *Diabetes Care*. 2019;42(8):1481-8.

251. Federico A, Dallio M, Masarone M, Gravina AG, Di Sarno R, Tuccillo C, et al. Evaluation of the Effect Derived from Silybin with Vitamin D and Vitamin E Administration on Clinical, Metabolic, Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress Parameters, and Serological Worsening Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1-12.

252. Darand M, Darabi Z, Yari Z, Hedayati M, Shahrbafe MA, Khoncheh A, et al. The effects of black seed supplementation on cardiovascular risk factors in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytother Res*. 2019;33(9):2369-77.

253. Cai H, Qin YL, Shi ZY, Chen JH, Zeng MJ, Zhou W, et al. Effects of alternate-day fasting on body weight and dyslipidaemia in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomised controlled trial. *BMC Gastroenterol*. 2019;19(1):219-27.

254. Darand M, Darabi Z, Yari Z, Saadati S, Hedayati M, Khoncheh A, et al. *Nigella sativa* and inflammatory biomarkers in patients with non-alcoholic fatty liver disease: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Complement Ther Med*. 2019;44:204-9.

255. Cheraghpour M, Imani H, Ommi S, Alavian SM, Karimi-Shahrbabak E, Hedayati M, et al. Hesperidin improves hepatic steatosis, hepatic enzymes, and metabolic and inflammatory parameters in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Phytother Res.* 2019;33(8):2118-25.
256. Castellino G, Nikolic D, Magán-Fernández A, Malfa GA, Chianetta R, Patti AM, et al. Altilix. *Nutrients.* 2019;11(11):2580-97.
257. Stanley TL, Fourman LT, Feldpausch MN, Purdy J, Zheng I, Pan CS, et al. Effects of tesamorelin on non-alcoholic fatty liver disease in HIV: a randomised, double-blind, multicentre trial. *Lancet HIV.* 2019;6(12):821-30.
258. Banitalebi E, Faramarzi M, Nasiri S, Mardaniyan M, Rabiee V. Effects of different exercise modalities on novel hepatic steatosis indices in overweight women with type 2 diabetes. *Clin Mol Hepatol.* 2019;25(3):294-304.
259. Ghatti FF, De Oliveira DG, De Oliveira JM, Ferreira LEVV, Cesar DE, Moreira APB. Effects of Dietary Intervention on Gut Microbiota and Metabolic-Nutritional Profile of Outpatients with Non-Alcoholic Steatohepatitis: a Randomized Clinical Trial. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2019;28(3):279-87.
260. Singh AK, Kaur N, Kaushal S, Tyagi R, Mathur D, Sivapuram MS, et al. Partitioning of radiological, stress and biochemical changes in pre-diabetic women subjected to Diabetic Yoga Protocol. *Diabetes Metab Syndr.* 2019;13(4):2705-13.